

Die Bildung von Protoporphyrin IX in *Escherichia coli*

**Charakterisierung der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III
Oxidase (HemF) und der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX
Oxidase**

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Daniela Breckau

aus Magdeburg

1. Referent: Prof. Dr. D. Jahn

2. Referent: Prof. Dr. D. Heinz

eingereicht am: 17.10.2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 14.12.2005

Druckjahr: 2006

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereiches für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Breckau, D., Mahlitz, E., Sauerwald, A., Layer, G. & Jahn, D. (2003) „Oxygen-dependent Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) from *Escherichia coli* Is Stimulated by Manganese” *J. Biol. Chem.*, 278, 46625-46631

Tagungsbeiträge

Breckau, D., Mahlitz, E., Sauerwald, A. & Jahn, D. (Poster) „The oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase HemF from *Escherichia coli* is a manganese enzyme“ (Poster) Gordon Research Conference on the Chemistry and Biology of Tetrapyrroles, Newport, Rhode Island, USA (2002).

Layer, G., Verfürth, K., Mahlitz, E., Breckau, D., and Jahn, D. (Poster) „Two enzymes for oxygen-dependent and independent decarboxylation of coproporphyrinogen III during bacterial tetrapyrrole biosynthesis“ 676th Meeting of the Biochemical Society, “Tetrapyrroles: their Birth, Life and Death”, Edinburgh, UK, 08.04. - 10.04.2002

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen und Glossar.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Tetrapyrrole.....	3
2.2	Die Enzyme der Häm Biosynthese.....	4
2.3	Coproporphyrinogen III Oxidasen.....	7
2.3.1	Die sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemN).....	8
2.3.2	Die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF).....	9
2.3.2.1	Postulierte Enzymmechanismen für die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF).....	10
2.4	Die Bildung von Protoporphyrin IX.....	12
2.4.1	Die sauerstoffabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase (HemY).....	12
2.4.2	Die sauerstoffunabhängige Oxidation von Protoporphyrinogen IX.....	14
2.5	Die alternativen Atmungswege von <i>Escherichia coli</i>.....	15
2.6	Zielsetzung der Arbeit.....	18
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Geräte und Chemikalien.....	19
3.1.1	Geräte.....	19
3.1.2	Chemikalien und Kits.....	20
3.2	Bakterienstämme und Plasmide.....	20
3.2.1	Bakterienstämme.....	20
3.2.2	Plasmide.....	21
3.3	Medien und Medienzusätze.....	22
3.3.1	Medien.....	22
3.3.2	Medienzusätze.....	23
3.4	Mikrobiologische Techniken.....	24
3.4.1	Sterilisation.....	24
3.4.2	Wachstumsbedingungen.....	24
3.4.2.1	Aerobe Zellzucht.....	24
3.4.2.2	Anaerobe Zellzucht.....	24

3.4.3	Bestimmung von Zelldichten.....	24
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	25
3.5.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR-Technik.....	25
3.5.2	Restriktion von DNA.....	25
3.5.3	Ligation von DNA.....	26
3.5.4	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	26
3.5.5	Transformation von Bakterien.....	26
3.5.6	Plasmid-DNA - Präparation.....	27
3.5.7	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	28
3.5.8	Agarose - Gelelektrophorese.....	28
3.6	Proteinchemische Methoden.....	29
3.6.1	Rekombinante Darstellung von <i>Escherichia coli</i> HemF.....	29
3.6.1.1	Rekombinante Proteinsynthese.....	29
3.6.1.2	Zellkultivierung.....	29
3.6.1.3	Zellaufschluss.....	29
3.6.1.4	Affinitätschromatographie an calmodulinhaltiger Matrix.....	30
3.6.1.5	Affinitätschromatographie an Calmodulin (mit Manganionen und W7).....	31
3.6.1.6	Protease - Verdau des Fusionsproteins.....	31
3.6.1.7	Konzentrierung.....	31
3.6.1.8	Anaerobe Proteinreinigung.....	31
3.6.2	Rekombinante Darstellung von <i>Thermosynechococcus elongatus</i> HemF.....	32
3.6.2.1	Rekombinante Proteinsynthese.....	32
3.6.2.2	Zellkultivierung	32
3.6.2.3	Zellaufschluss	32
3.6.2.4	Affinitätschromatographie über Hitrap Chelating HP Säule.....	33
3.6.2.5	Gelpermeationschromatographie	33
3.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
3.6.4	Natriumdedecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.6.5	Bestimmung der Aktivität von HemF.....	35
3.6.5.1	Prinzip des Enzymtest.....	35
3.6.5.2	Darstellung des Substrats Coproporphyrinogen III	36
3.6.5.3	Bedingungen des Enzymtests.....	36
3.6.5.4	Anaerober Enzymtest.....	37

3.6.6	Nachweis von Wasserstoffperoxid als Produkt der von HemF katalysierten Reaktion.....	37
3.6.7	Herstellung von Membranfraktionen verschiedener <i>Escherichia coli</i> Stämme	37
3.6.7.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> DW35.....	37
3.6.7.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> DW35/pH3.....	37
3.6.7.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> SASX38.....	38
3.6.7.4	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(λDE3).....	38
3.6.7.5	Isolierung der Membranfraktionen mittels Zentrifugation.....	38
3.6.8	Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase aus <i>Escherichia coli</i>	39
3.6.8.1	Herstellung eines anaeroben Zellextrakt von <i>E. coli</i>	39
3.6.8.2	Isolierung der Membranfraktion von <i>E. coli</i> mittels Sucrose Gradientenzentrifugation.....	39
3.6.8.3	Solubilisierung der Membranproteine.....	40
3.6.8.4	Chromatographische Reinigung über DEAE Sepharose FF.....	40
3.6.8.5	Chromatographische Reinigung über Kationentauscher.....	40
3.6.8.6	Chromatographische Reinigung über Blue Sepharose FF.....	41
3.6.8.7	Dialyse	41
3.6.9	Bestimmung der Aktivität der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase.....	41
3.6.9.1	Prinzip des Enzymtest.....	41
3.6.9.2	Darstellung des Substrats Protoporphyrinogen IX.....	42
3.6.9.3	Bedingungen des Enzymtests.....	42
3.6.9.4	Addition von verschiedenen Elektronenakzeptoren zum Enzymtest.....	43
3.7	Biophysikalische Methoden.....	43
3.7.1	UV-Vis Absorptionsspektroskopie.....	43
3.7.2	Atomabsorptionsspektroskopie.....	43
3.7.3	Metallbestimmung mittels Elektronenspinresonanz – Spektroskopie (ESR)....	45
3.8	Methoden der Bioinformatik.....	46
3.8.1	Datenbanksuche mit den BLAST – Programmen.....	46
4	Ergebnisse und Diskussion.....	47
4.1	Untersuchungen der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase HemF aus <i>Escherichia coli</i>.....	47

4.1.1	Produktion und Reinigung von <i>E. coli</i> HemF und von HemF Varianten.....	47
4.1.2	Sauerstoff dient bei der HemF Katalyse als Elektronenakzeptor und führt zur Bildung von H ₂ O ₂	48
4.1.3	Manganionen sind essentiell für die sauerstoffabhängige HemF Katalyse.....	50
4.1.4	Nachweis der Manganbindung an HemF und daran beteiligte Histidine	53
4.1.4.1	Atomabsorptionsspektroskopie.....	53
4.1.4.2	Elektronenspinresonanz - Spektroskopie.....	54
4.1.5	Nachweis der Porphyrinbindung an HemF und daran beteiligte Histidine.....	56
4.1.6	Die Bedeutung der Histidinreste für die Mangan- und/oder Porphyrinbindung an HemF.....	56
4.1.7	Möglicher Enzymmechanismus für die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase.....	58
4.2	Rekombinante Produktion und Reinigung des HemF aus	
	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	60
4.3	Die sauerstoffunabhängige Oxidation von Protoporphyrinogen IX.....	62
4.3.1	Nachweis von Protoporphyrinogen IX Oxidase Aktivität in Zellextrakt von <i>Escherichia coli</i>	63
4.3.1.1	Aktivitätsmessung mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	63
4.3.1.2	Triphenyl-tetrazoliumchlorid kann als alternativer Elektronenakzeptor für die Oxidation von Protoporphyrinogen IX verwendet werden.....	64
4.3.2	Die sauerstoffunabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase aus <i>E. coli</i> ist ein Membran assoziiertes Protein.....	67
4.3.3	Die Kopplung der Oxidation von Protoporphyrinogen IX mit der Atmungskette.....	68
4.3.3.1	Elektronen werden von der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase auf die Fumarat Reduktase übertragen.....	68
4.3.3.2	HemG ist an der Oxidation von Protoporphyrinogen IX beteiligt.....	69
4.3.3.3	Der Elektronenfluss bei der Oxidation von Protoporphyrinogen IX.....	70
4.3.4	Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase aus <i>E. coli</i>	72
4.3.4.1	Solubilisierung von Proteinen aus der Membranfraktion.....	72
4.3.4.2	Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase über Anionenaustausch Chromatographie an DEAE Sepharose FF.....	73

4.3.4.3 Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase über Kationenaustausch Chromatographie an CM Sepharose FF und SP Sepharose FF sowie über Blue Sepharose FF.....	74
4.3.4.4 Zusammenfassung der Reinigungsschritte.....	76
4.3.5 Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Proteinfractionen.....	78
4.3.5.1 Das hypothetische Protein YqjD.....	80
4.3.5.2 Das hypothetische Protein YijP.....	81
5 Zusammenfassung.....	83
6 Ausblick.....	84
7 Literatur und Internet - Adressen.....	85
7.1 Literatur.....	85
7.2 Internet – Adressen.....	97
8 Anhang.....	99
Danksagung	

1 Abkürzungen und Glossar

A_{λ}	Absorption bei der Wellenlänge λ in nm
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Absorption Units
CBP	Calmodulinbindungspeptid
CD	Circular Dichroism (Zirkulardichroismus)
Copro	Coproporphyrin III
Coprogen	Coproporphyrinogen III
CPO	Coproporphyrinogen III Oxidase
Da	Dalton
DCIP	2,6-Dichloroindophenol
dI	Änderung der Fluoreszenzintensität
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-Tetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz - Spektroskopie
fw	forward (vorwärts)
g	Erdbeschleunigung (Gravitation)
G	Gauss
GHz	Gigahertz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
M_r	relative molekulare Masse
MP	Megapascal
NAD	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute
OD_{λ}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
Pa	Pascal
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PPO	Protoporphyrinogen IX Oxidase

Proto	Protoporphyrin IX
Proto	Protoporphyrinogen IX
psi	Pounds per square inch
rev	reverse (rückwärts)
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TTC	2, 3, 5- Triphenyl-tetrazoliumchlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV - VIS	Ultravioletter- und sichtbarer Bereich des Lichtes
v/v	Volumenanteil pro Volumen
W7	N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalen Sulfonamid HCl
WT	Wild-Typ
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
W	Watt
μ	micro

2 Einleitung

2.1 Tetrapyrrole

Die Familie der Tetrapyrrole, bestehend aus strukturell und funktionell verwandten Molekülen, ist an vielen eukaryotischen und prokaryotischen zellulären Prozessen beteiligt. Sie dienen als prosthetische Gruppe verschiedener Enzyme, als redoxaktive Moleküle in Elektronen- und Sauerstofftransportprozessen und als Photorezeptoren in Photosystemen (Jordan, 1991; Jahn *et al.*, 1996; Frankenberg *et al.*, 2003). Man unterteilt Tetrapyrrole in acht verschiedene Klassen: Häm, Chlorophylle, Bakteriochlorophylle, Corrinoide (z.B. Vitamin B₁₂), Cofaktor F₄₃₀, Häm *d*₁, Sirohäm und offenkettige Tetrapyrrole (z.B. Biline und Phycobiline) (Abb. 1).

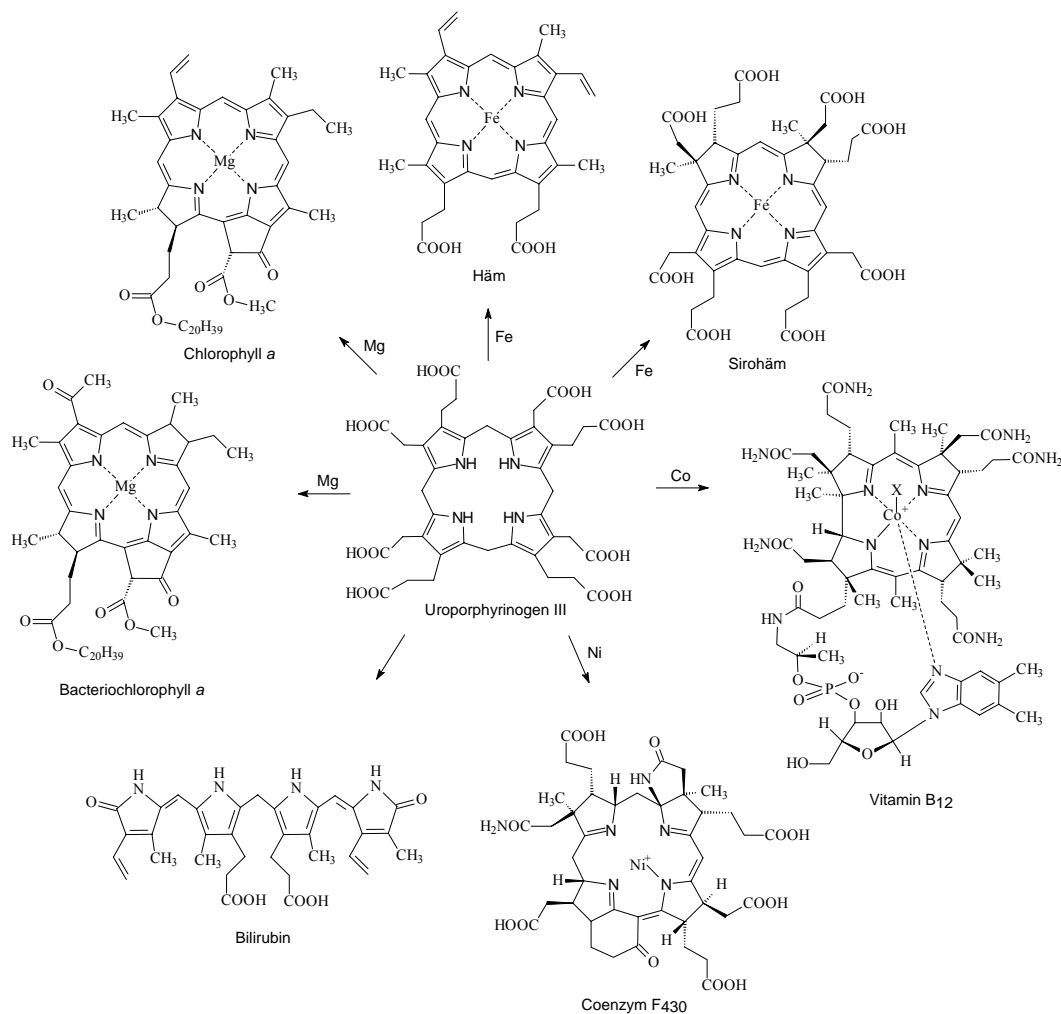


Abbildung 1: Strukturen von wichtigen Vertretern verschiedener Tetrapyrrolklassen mit ihrem gemeinsamen Vorläufermolekül Uroporphyrinogen III.

Tetrapyrrole sind ringförmige Moleküle, die als Grundbaustein einen Stickstoff enthaltenden, fünfgliedrigen Heterocyclus aufweisen. Im Tetrapyrrol sind die einzelnen Pyrrole über Methinbrücken miteinander verknüpft. Die verschiedenen Tetrapyrrole unterscheiden sich in folgenden Merkmalen: dem Oxidationszustand des Ringsystems, der Art des zentralen Metallions und den Seitenketten. Im Falle des Vitamin B₁₂ ist zusätzlich die Struktur des Ringsystems verändert. Aufgrund des Ringsystems und der koordinierten Metallionen können Tetrapyrrole redoxaktiv sein. Da sie ein konjugiertes π Elektronensystem mit teilweise aromatischem Charakter besitzen, das in der Lage ist sichtbares Licht aus dem Sonnenspektrum selektiv zu absorbieren, erscheinen viele Tetrapyrrole farbig. So erscheinen z.B. photosynthetisch aktive Pflanzen durch große Mengen an Chlorophyll grün und unser Blut durch das enthaltende Häm des Hämoglobins rot.

2.2 Die Enzyme der Häm Biosynthese

Das strukturell gleiche Grundgerüst aller Tetrapyrrole legt einen hochkonservierten Biosyntheseweg nahe. Dabei trennt sich der Syntheseweg der Porphonoide, wie z.B. Sirohäm und Cofaktor F₄₃₀, sowie der Corrinoide bereits nach fünf Schritten von dem der Porphyrine, wie den Hämen und Chlorophyllen (Abb. 2).

Das allgemeine Vorläufermolekül aller bekannten Tetrapyrrole ist die 5-Aminolävulinsäure (ALA). Sie kann auf zwei verschiedenen Wegen in der Natur synthetisiert werden. Säuger, Vögel, Hefen und die α -Gruppe der Proteobakterien bilden ALA über den Shemin-Weg (Shemin *et al.*, 1953). Hierbei kondensieren die Ausgangsmoleküle Succinyl-CoA und Glycin unter Freisetzung von CO₂ und Coenzym A zu ALA. Diese Reaktion wird durch die Pyridoxalphosphat-abhängige ALA-Synthase (ALAS) katalysiert (Kikuchi *et al.*, 1958, Astner *et al.*, 2005). Der Shemin-Weg galt lange Zeit als ubiquitär (Jordan, 1991). Erst in den siebziger Jahren wurde ein alternativer Weg entdeckt (Beale *et al.*, 1973), dessen Details erst Mitte der achtziger Jahre aufgeklärt wurden (Jahn *et al.*, 1992). Diesen so genannten C₅-Weg benutzen höhere Pflanzen, Algen, Archaea, sowie die meisten Bakterien zur ALA-Synthese. Dabei wird ALA ausgehend von einer mit Glutamat beladenen tRNA (Glutamyl-tRNA) in zwei Schritten synthetisiert. Zunächst wird die Glutamyl-tRNA durch eine NADPH-abhängige Reaktion mittels der Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR, kodiert durch *hema*) in Glutamat-1-Semialdehyd

(GSA) und die freie tRNA umgewandelt (Jahn *et al.*, 1991a; Moser *et al.*, 1999; Schauer *et al.*, 2002). Anschließend wird Glutamat-1-Semialdehyd durch die Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSAM, kodiert durch *hemL*) in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion zu ALA transaminiert (Jahn *et al.*, 1991b; Ilag *et al.*, 1992). Ungewöhnlich an dem C₅-Weg ist die Aktivierung der zu reduzierenden Carboxylgruppe des Glutamats durch eine Esterbindung zur tRNA. Auffällig ist die ungewöhnliche V-förmige Struktur der GluTR, die zur Postulierung eines GluTR/GSAM-Komplexes führte (Moser *et al.*, 2001). Die Existenz dieses Komplexes konnte kürzlich nachgewiesen werden (Lüer *et al.*, 2005).

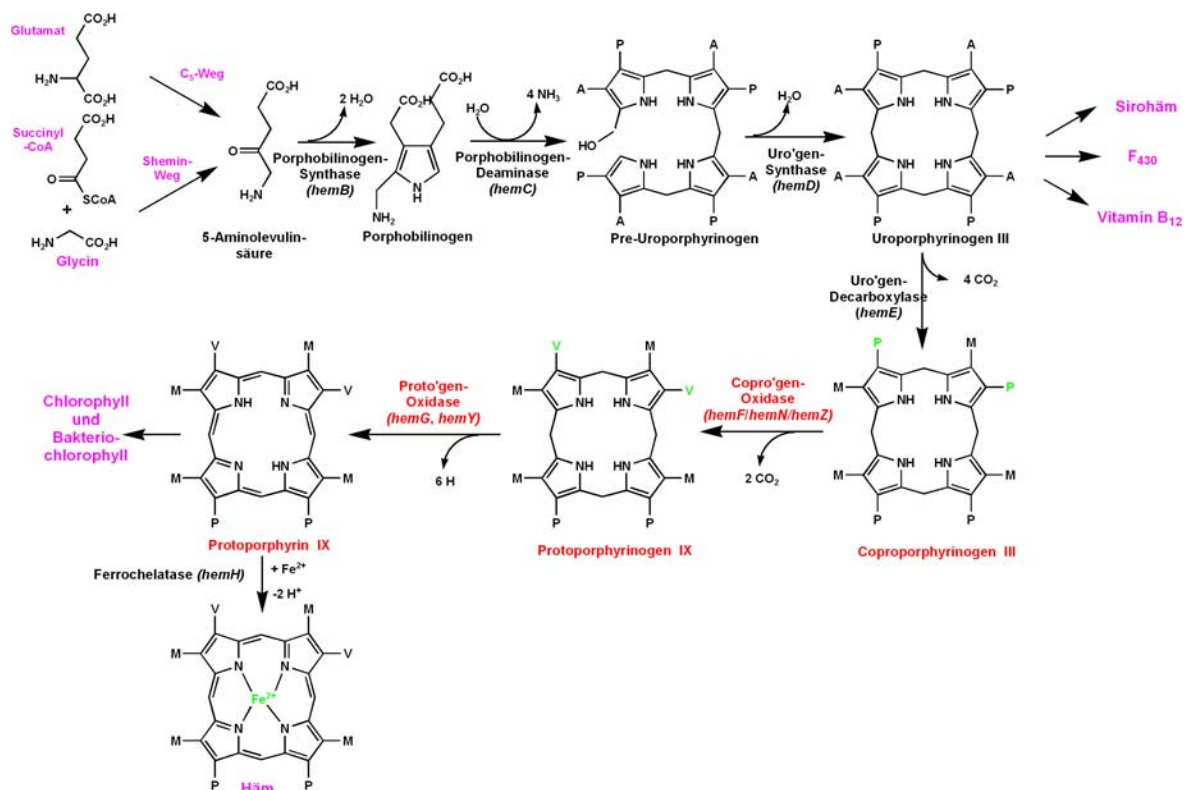


Abbildung 2: Übersicht über die Häm Biosynthese. Benannt sind die für die einzelnen Schritte relevanten Enzyme. In Klammern sind bekannte, zugehörige Gene bakteriellen Ursprungs genannt. A, Acetatgruppe; P, Propionatgruppe; M, Methylgruppe; 'gen, porphyrinogen.

Im nächsten Schritt der Tetrapyrrol Biosynthese katalysiert die Porphobilinogen-Synthase (PBGS, kodiert durch *hemB*) die asymmetrische Kondensation zweier ALA-Moleküle zum Monopyrrol Vorläufer Porphobilinogen (Frankenberg *et al.*, 1999a, b, c). Die PBGS Enzyme aus verschiedenen Organismen sind alle metallabhängig, wobei einige

Enzyme Zink für die Katalyse verwenden und andere Magnesium und/oder Kalium (Shoolingin-Jordan, 2002) enthalten. Vier Porphobilinogen Moleküle werden durch die Porphobilinogen Deaminase (PBGD, kodiert durch *hemC*) zu dem instabilen linearen Prä-Uroporphyrinogen verknüpft (Warren *et al.*, 1988; Louie *et al.*, 1992) und in einer Folgereaktion von der Uroporphyrinogen III Synthase (UROS, kodiert durch *hemD*) zum Uroporphyrinogen III zyklisiert. Die Zyklisierung erfolgt unter Inversion des Pyrrolrings D (Chadwick und Ackrill, 1994), wodurch ein asymmetrisches Tetrapyrrol gebildet wird, das so zielgerichtet modifiziert werden kann. Seine Metabolisierung stellt den ersten Verzweigungspunkt in der Tetrapyrrol Biosynthese dar. Zum einen werden ausgehend vom Uroporphyrinogen III die Porphonoide (Corrinoide, Sirohäme, Häm *d_I* und der Cofaktor F₄₃₀) und andererseits die Porphyrine (Häm, Chlorophylle und Bakteriochlorophylle) gebildet.

Zur Biosynthese von Häm- und Chlorophyll- Vorläufermolekülen werden vier Acetatreste des Uroporphyrinogens III schrittweise zu Methylgruppen unter Bildung von Coproporphyrinogen III decarboxyliert. Die Uroporphyrinogen III Decarboxylase (UROD, kodiert durch *hemE*) beginnt diese Reaktion am Ring D und setzt sie an Ring A, B und C in Uhrzeigersinn fort (Luo *et al.*, 1993). Protoporphyrinogen IX, das nächste Zwischenprodukt, wird durch oxidative Decarboxylierung aus Coproporphyrinogen III gebildet. Dabei werden die Propionatgruppen an den Ringen A und B zu Vinylgruppen umgesetzt. Katalysiert wird diese Reaktion von verschiedenen Coproporphyrinogen III Oxidasen (CPO, kodiert durch *hemF/N*), welche in Abschnitt 2.3 genauer beschrieben sind. Protoporphyrinogen IX wiederum wird von der Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO, kodiert durch *hemY/G*) zum farbigen aromatischen Protoporphyrin IX umgewandelt, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben.

Protoporphyrin IX ist das gemeinsame Vorläufermolekül von Hämen und Chlorophyllen. Durch Eiseninsertion, katalysiert durch Ferrochelatase (Fc, kodiert durch *hemH*), wird Protohäm IX (Häm *b*) gebildet, von dem sich alle anderen Häme ableiten. Mit der Komplexierung von Mg²⁺ durch die Magnesiumchelatase beginnt die Synthese der Chlorophylle und Bakteriochlorophylle.

2.3 Coproporphyrinogen III Oxidasen

Coproporphyrinogen III Oxidasen katalysieren die Umsetzung von Coproporphyrinogen III (Coprogen) zu Protoporphyrinogen IX (Protogen) (Abb. 3). Bei dieser Reaktion werden in einer oxidativen Decarboxylierung die Propionatgruppen an den Ringen A und B des Tetrapyrrols zu Vinylgruppen umgesetzt. Der Mechanismus verläuft über eine antiperiplanare Eliminierung, gepaart mit der Abstraktion des *si*-Wasserstoffatoms in β -Position zur Propionatgruppe in Form eines Hydrids (Seehra *et al.*, 1983). Diese Freisetzung eines Hydrids zeigt die Notwendigkeit eines Elektronenakzeptors. Zuerst wird die Propionatgruppe des A-Rings umgesetzt und danach die des B-Rings, wobei das Zwischenprodukt (Harderoporphyrinogen) isolierbar ist (Jackson *et al.*, 1980). Diese enzymatisch katalysierte Reaktion wurde den Genprodukten von *hemF*, *hemN* und *hemZ* zugeschrieben (Troup *et al.*, 1994, 1995; Homuth *et al.*, 1999). Dabei galt HemF als sauerstoffabhängiges und HemN bzw. HemZ als sauerstoffunabhängige Enzyme. Die drei CPO's weisen nur geringe Aminosäuresequenzhomologien auf und sind auch strukturell nicht miteinander verwandt.

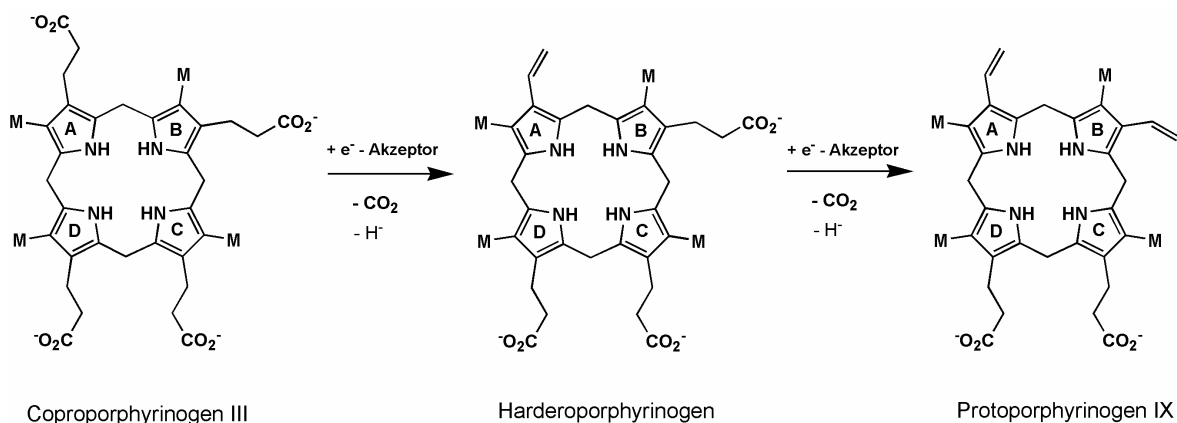


Abbildung 3: Die von den CPO's katalysierte Umsetzung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX. M, Methylgruppe.

2.3.1 Die sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemN)

Die sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase HemN gehört zu der „Radikal-SAM“ Proteinfamilie (Sofia *et al.*, 2001; Layer *et al.*, 2002, 2003, 2004). Alle Mitglieder dieser Familie besitzen ein [4Fe-4S]-Zentrum, welches über drei Cysteinreste in dem charakteristischen Motiv CxxxCxxC (Sofia *et al.*, 2001) koordiniert wird. Neben dem SAM und dem [4Fe-4S]-Zentrum benötigt HemN für seine Aktivität NAD(P)H sowie einen noch nicht identifizierten Elektronenakzeptor (Layer *et al.*, 2002). Vor kurzem konnte die Kristallstruktur des monomeren *E. coli* HemN zusammen mit dem Cofaktor SAM gelöst werden (Abb. 4) (Layer *et al.*, 2003). Interessanterweise befinden sich zwei SAM Moleküle im Protein, von denen eines das vierte Eisen des [4Fe-4S]-Zentrums koordiniert. Mit Hilfe von ESR- Spektroskopie gelang der Nachweis eines Substratradikals (Layer, 2004, Layer *et al.*, 2005), womit ein radikalischer Enzymmechanismus postuliert werden konnte. Im ersten Schritt der HemN Katalyse wird das [4Fe-4S]-Zentrum reduziert und anschließend das SAM homolytisch in Methionin und ein 5'-Deoxyadenosyl Radikal gespalten. Das 5'-Deoxyadenosyl Radikal abstrahiert dann ein Wasserstoff vom β -C Atom der Propionatseitenkette des Substrats und generiert das zugehörige Substratradikal. Im letzten Schritt der Protoporphyrinogen IX Synthese wird unter Abspaltung von CO₂ die Vinylgruppe gebildet (Layer *et al.*, 2002).

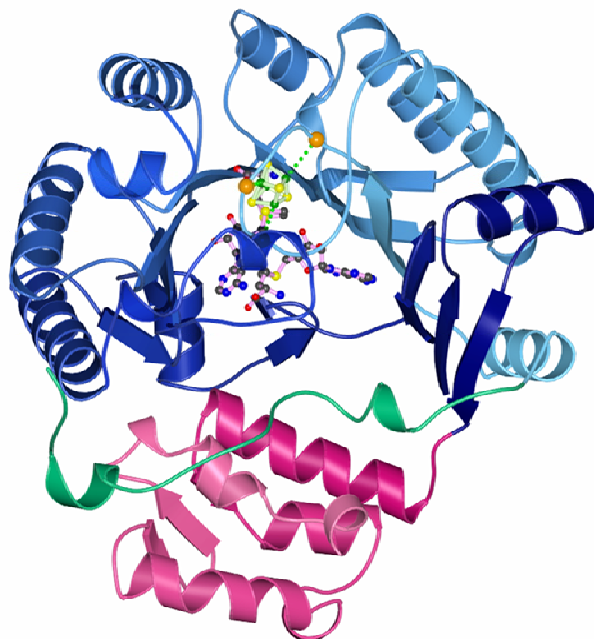


Abbildung 4: Kristallstruktur von *Escherichia coli* HemN. HemN besteht aus zwei unterschiedlichen Domänen (blau: katalytische Domäne und rot: Deckel) und aus einer verlängerten N-terminalen Region, die trip-wire genannt wird (grün). Mit abgebildet sind das [4Fe-4S] Zentrum und zwei SAM Moleküle (Layer *et al.*, 2003).

2.3.2 Die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF)

Die meisten Daten über sauerstoffabhängige CPO's stammen von Enzymen aus eukaryotischen Quellen. Dort ist das Enzym im intermitochondrialen Membranraum lokalisiert (Elder *et al.* 1978; Grandchamp *et al.*, 1978; Smith *et al.*, 1993). Mittlerweile sind neben den vielen Eukaryoten eine ganze Reihe von Bakterien bekannt, die ebenfalls eine sauerstoffabhängige CPO besitzen. Die Aminosäuresequenzhomologien zwischen allen bekannten HemF aus Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien sind mit 70-90 % ungewöhnlich groß. Zu anderen Enzymen weist HemF keine markanten Homologien auf. Bisherige enzymatische Untersuchungen zeigen die Notwendigkeit von Sauerstoff für die katalysierte Reaktion. Cofaktoren können weitgehend ausgeschlossen werden. Es existieren allerdings verschiedene, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse über den Metallgehalt in HemF. So wurde Kupfer in rekombinantem HemF aus der Maus (Kohno *et al.*, 1996), Eisen in nativem HemF aus Hefe (Camadro *et al.*, 1986; Labbe, 1997) und kein Metall in rekombinantem humanem HemF (Medlock, 1996) nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den hohen Sequenzhomologien zwischen den Enzymen aus verschiedenen Organismen. Der Einsatz von Aminosäuremodifikationsreagenzien deutet darauf hin, dass Tyrosinreste an der Katalyse beteiligt sind (Yoshinaga *et al.*, 1980b). Mutagenese Studien zeigen die Bedeutung des hochkonservierten His158 - Restes im Maus HemF für die enzymatische Aktivität (Kohno *et al.*, 1996). Basierend auf der Annahme, dass HemF eine Cofaktor- und Metallion- unabhängige Katalyse ausübt postulierten Colloc'h und Mitarbeiter gemeinsame strukturelle Eigenschaften für HemF und die Urat Oxidase, welche ebenfalls Sauerstoff verwendet (Colloc'h *et al.*, 2002). Die Kristallstruktur der Hefe CPO weist jedoch keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit der Urat Oxidase auf (Phillips *et al.*, 2004). Die Hefe CPO kristallisiert als Dimer, in dem sich die β -Faltblattstränge der einzelnen Monomere, die von Helices umgeben sind, gegenüberliegen (Abb. 5). Phillips *et al.*, 2004 postuliert ein aktives Zentrum in dem interessanterweise kein Metall und kein Cofaktor gebunden sind. Bis jetzt ungeklärt ist die Frage nach dem enzymatischen Mechanismus und wie der molekulare Sauerstoff am Enzym gebunden wird.

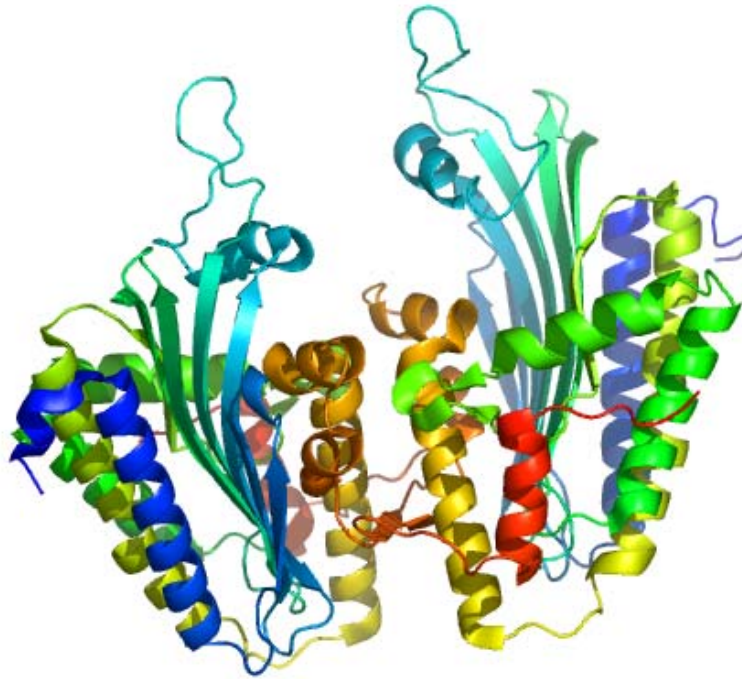


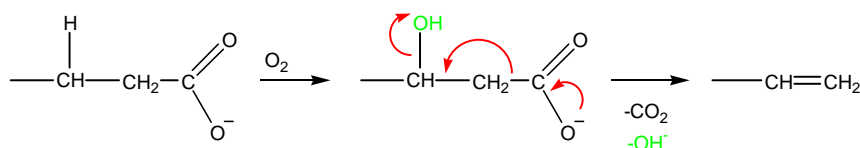
Abbildung 5: Kristallstruktur von Hefe CPO. Die Coproporphyrinogen III Oxidase ist ein dimeres Enzym, an das keine Cofaktoren gebunden sind (Phillips *et al.*, 2004).

2.3.2.1 Postulierte Enzymmechanismen für die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF)

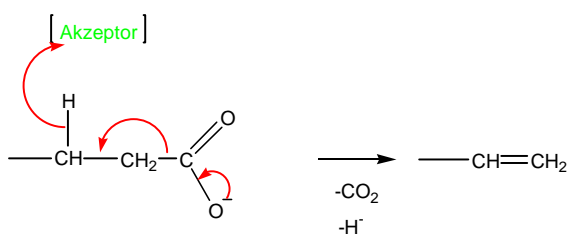
Anfang der achtziger Jahre wurden mechanistische Untersuchungen bezüglich der Regio- und Stereoselektivität der von sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidasen katalysierten Reaktion mit Hilfe von Isotopen markierten Substraten durchgeführt (Seehra *et al.*, 1983). Sie ergaben, dass die Decarboxylierungsreaktion über einen antiperiplanaren Eliminierungsmechanismus verläuft, in dem das β -H_{Si}-Atom der Propionatgruppe zusammen mit der Carboxygruppe als Abgangsgruppen fungieren. Diese Ergebnisse schlossen die Bildung von Acryl- oder β -Oxosäure-Intermediaten aus. Bisher wurden drei unterschiedliche Mechanismen postuliert, aber nicht bewiesen (Akhtar, 1994) (Abb. 6). In Mechanismus 1 wird das Substrat zunächst durch eine β -Hydroxylierung der Propionatseitenketten für den darauf folgenden Eliminierungsprozess aktiviert. Dieser von Yoshigana & Sano postulierte Mechanismus basiert auf ihren Beobachtungen, dass HemF unter anaeroben Bedingungen das Substratanalogon 3-(β -hydroxypropionat)-8-propionat Porphyrinogen IX umsetzen kann (Akhtar, 1994), sowie auf dem Nachweis, dass das mittels des tyrosinspezifischen Modifikationsreagenz Tetranitromethan inaktivierte

Enzym in Gegenwart des 2,4-bis-(β -hydroxypropionat) Porphyrinogen IX aktiv ist (Yoshinaga & Sano, 1980a). Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass ein oder mehrere Tyrosinreste an der Hydroxylierungsreaktion beteiligt sind. Beim vorgeschlagenen Mechanismus 2 erfolgt die Vinylbildung durch eine simultane Decarboxylierung und Hydridabstraktion, wobei der Elektronenakzeptor die Reaktionsabfolge auslöst. Mechanismus 3 stellt eine zweistufige Variante von Mechanismus 2 dar, in der zunächst die Hydridabstraktion, unterstützt durch das vinyloge Stickstoffatom des Pyrrolringes, erfolgt. Das positiv geladene Stickstoffatom des Pyrrolringes erleichtert nun durch seinen Elektronenzug die Decarboxylierungsreaktion.

Mechanismus 1:



Mechanismus 2:



Mechanismus 3:

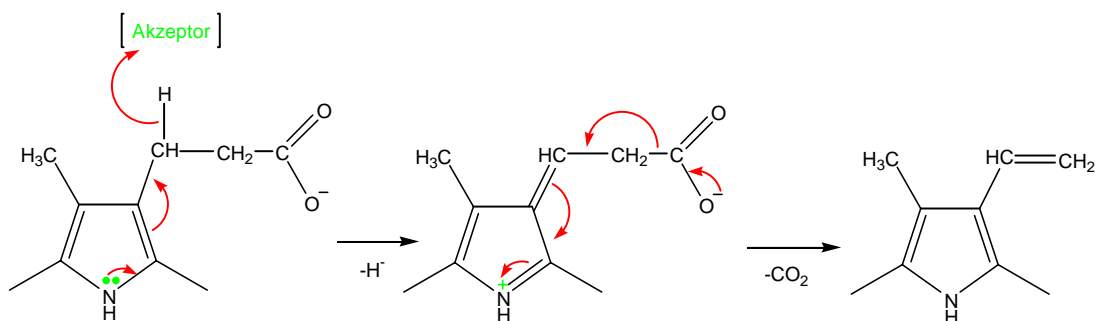


Abbildung 6: Die für die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase postulierten Reaktionsmechanismen (Akhtar, 1994).

2.4 Die Bildung von Protoporphyrin IX

Der letzte gemeinsame Schritt der Biosynthese von Häm und Chlorophyll, die Umsetzung von Protoporphyrinogen IX (Protogen) zu Protoporphyrin IX (Proto), wird von Protoporphyrinogen IX Oxidasen katalysiert. Bei dieser Reaktion werden zwei der vier Iminogruppen des Pyrrols und vier Brückenkohlenstoffatome oxidiert, wobei drei neue Doppelbindungen entstehen (Abb. 7) (Poulson, 1976; Poulson *et al.*, 1975; Dailey, 1990). Die Oxidation erfolgt unter Abspaltung von sechs Protonen, wobei als Produkt der Reaktion ein voll konjugierter, planarer und farbiger Makrozyklus entsteht.

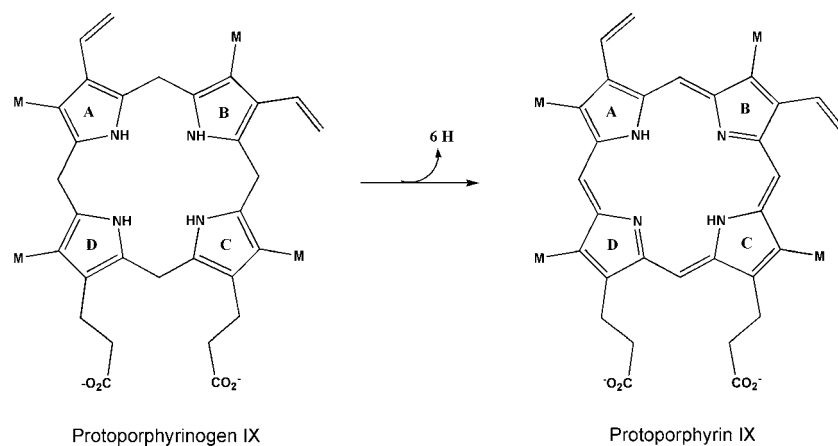


Abbildung 7: Die von PPO's katalysierte Umsetzung von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX.

2.4.1 Die sauerstoffabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase (HemY)

Die sauerstoffabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase wird von dem Gen *hemY* kodiert. Bei der Bildung von Protoporphyrin IX unter aeroben Bedingungen dient molekularer Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor. Dabei werden pro Mol Substrat drei Mol O_2 zu drei Mol H_2O_2 reduziert. Bisher am besten charakterisiert sind die eukaryotischen PPO's. Sie sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Deybach *et al.*, 1985; Camadro *et al.*, 1994) und dabei mit der aktiven Seite zum Zytosol gerichtet (Ferreira *et al.*, 1988). In Pflanzen existieren zwei Isoformen der PPO, die plastidäre PPO I und die mitochondriale PPO II (Jacobs *et al.*, 1984, 1987). Beide Formen der PPO aus *N. tabacum* weisen eine Identität von lediglich 27 % auf (Lermontova *et al.*,

1997). Dieser Typ sauerstoffabhängiger PPO wird auch in einer Reihe von Bakterien, wie z.B. *Bacillus subtilis* (Hansson *et al.*, 1992, 1994; Dailey *et al.*, 1994, Corrigan *et al.*, 1998), *Myxococcus xanthus* (Dailey *et al.*, 1996) oder *Aquifex aeolicus* (Wang *et al.*, 2001), gefunden. Dabei scheint das Vorkommen auf Gram positive Bakterien beschränkt zu sein. Die sauerstoffabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase gehört zur Familie der FAD-haltigen Oxidasen (Dailey *et al.*, 1998). Das Enzym aller untersuchten Organismen enthält einen nicht kovalent gebundenen Flavin Cofaktor; in den meisten Fällen FAD (Siepker *et al.*, 1987; Camadro *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 2004). Während die mitochondriale PPO aus Tabak als Homodimer vorkommt (Abb. 8), existiert das Enzym aus *B. subtilis* als monomere Form (Dailey *et al.*, 1994). Im Jahr 2004 gelang es Koch und Mitarbeitern die mitochondriale PPO aus *N. tabacum* zu kristallisieren. Die Struktur ist ein Homodimer, dessen Monomere aus je einer FAD-, einer Substrat- und einer Membran-Bindedomäne bestehen (Koch *et al.*, 2004). Aufgrund der gelösten Kristallstruktur des Nachfolgeenzym, der humanen Ferrochelatase (Wu *et al.*, 2001), postulierte Koch ein potentiell Substratchanneling von Protoporphyrin IX von der PPO direkt zur Ferrochelatase. Auch die Beteiligung des vorhergehenden Enzyms Coproporphyrinogen III Oxidase an diesem Komplex ist nicht auszuschließen (Koch *et al.*, 2004).

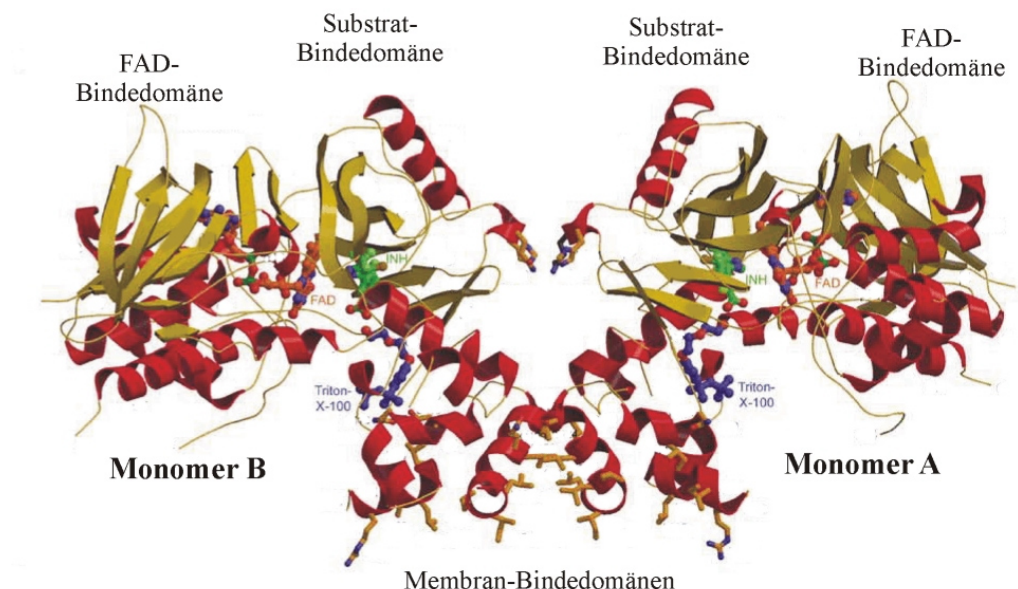


Abbildung 8: Struktur der mitochondrialen PPO aus *Nicotiana tabacum*. Die Protoporphyrinogen IX Oxidase ist ein Dimer, dessen Monomere aus je einer FAD-, einer Substrat- und einer Membran-Bindedomäne bestehen. Mit abgebildet sind der Inhibitor Phenylpyrazol (grün), der FAD-Cofaktor (orange) sowie gebundenes Triton X100 (blau). (Koch *et al.*, 2004)

2.4.2 Die sauerstoffunabhängige Oxidation von Protoporphyrinogen IX

Innerhalb der Bakterien existiert neben dem sauerstoffabhängigen System für die Oxidation von Protoporphyrinogen IX, kodiert von *hemY*, ein zweites sauerstoffunabhängiges System. Bei der Analyse einer *E. coli* K12 Mutante, die Protoporphyrinogen akkumulierte und defekt in der Protoporphyrinogen Oxidase Aktivität war, wurde das Gen *hemG* identifiziert (Sasarman *et al.*, 1979). Durch die Expression von *hemG* konnte die Mutante komplementiert werden. Biochemische Analysen zeigten PPO Aktivität im *E. coli* Zellextrakt und in der Membranfraktion (Sasarman *et al.*, 1993). Durch Komplementation der *E. coli hemG* Mutante konnte die cDNA für das humane HemY kloniert werden (Nishimura *et al.*, 1995). Für das 21 kDa große Enzym allein konnte bis jetzt noch keinerlei Aktivität nachgewiesen werden. Spekuliert wird die Zugehörigkeit von HemG zu einem größeren Enzymkomplex (O'Brian *et al.*, 2002). BLAST Analysen der Proteinsequenz von HemG über die NCBI Datenbank zeigen Homologien zu einer konservierten Domäne des Flavodoxins (Abb. 9) und geben so einen ersten Hinweis auf mögliche Arten der Elektronenübertragung durch die sauerstoffunabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase. Bis heute wurde das *hemG* Gen nur in *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella multocoda*, *Mesorhizobium loti* und *Yersinia pestis* nachgewiesen (O'Brian *et al.*, 2002). Da aber viele Mikroorganismen weder ein Gen für *hemY* noch für *hemG* besitzen (Panek *et al.*, 2002) muss entweder ein alternatives Enzymsystem existieren oder die Protogen Oxidase Funktion von einem anderen bereits bekannten Enzym übernommen werden.

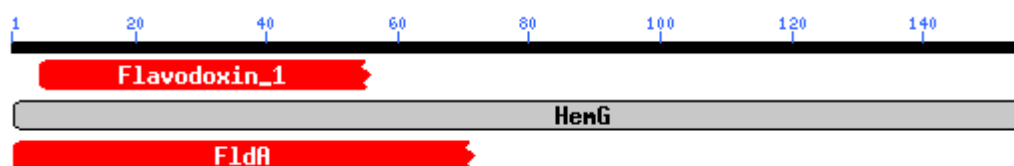


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Ergebnis der Suche nach konservierten Domänen von HemG mit Hilfe der NCBI Datenbank.

Die Bildung von Protoporphyrin IX unter anaeroben Bedingungen kann in Extrakten aus *E. coli* beobachtet werden, wenn Nitrat oder Fumarat als Elektronenakzeptor dienen (Jacobs *et al.*, 1975, 1976). In *E. coli* (Jacobs *et al.*, 1977a, 1977b, 1978), in

Rhodopseudomonas spheroides, heute *Rhodobacter sphaeroides*, (Jacobs *et al.*, 1981) und in *Desulfovibrio gigas* (Klemm *et al.*, 1985) ist die Oxidation von Protoporphyrinogen IX mit der Elektronentransportkette gekoppelt. Das gereinigte Enzym aus *Desulfovibrio gigas* ist ein Komplex, der aus drei unterschiedlichen Proteinen mit einer relativen Masse von je 12000, 18500 und 57000 besteht. Die bei der Oxidation von Protoporphyrinogen IX frei werdenden Elektronen kann das sauerstoffunabhängige Enzym aus *D. gigas* auf den artifiziellen Elektronenakzeptor DCIP übertragen (Klemm *et al.*, 1987).

2.5 Die alternativen Atmungswege von *Escherichia coli*

E. coli besitzt die Fähigkeit in einer Vielzahl von Umweltbedingungen, sowohl mit als auch ohne Sauerstoff, zu überleben. Dabei kann der Stoffwechsel speziell an die jeweils vorhandenen Substrate und Elektronenakzeptoren angepasst werden. Das spiegelt sich auch innerhalb der Tetrapyrrol Biosynthese wider, wo z.B. die Umsetzung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX entweder von dem sauerstoffabhängigen Enzym HemF oder von dem sauerstoffunabhängigen Enzym HemN katalysiert werden kann. Da es sich bei der nachfolgenden, noch nicht genauer charakterisierten Umsetzung zu Protoporphyrin IX ebenfalls um eine Oxidationsreaktion handelt, wäre, mit Hinblick auf das bereits charakterisierte, sauerstoffabhängige HemY und der beschriebenen sauerstoffunabhängigen Reaktion in *E. coli*, auch hier das Vorhandensein mehrerer Systeme vorstellbar.

Details zu den verschiedenen Atmungswegen und der Regulation der aeroben/anaeroben Genexpression finden sich in vielen zusammenfassenden Reviews (Gunsalus, 1992; Gunsalus *et al.*, 1994, Guest *et al.*, 1996; Darwin *et al.*, 1996; Unden *et al.*, 1997). Um sich an das Leben in den unterschiedlichen Umweltbedingungen anzupassen besitzt *E. coli* eine Vielzahl von Atmungsketten, welche aus primären Dehydrogenasen und terminalen Reduktasen oder Oxidasen, die miteinander über den Quinon Pool gekoppelt sind, bestehen. Während des aeroben Wachstums synthetisiert *E. coli* zwei verschiedene Cytochrom Oxidasen, die jeweils unterschiedliche Substrataffinitäten und Reaktionsraten besitzen. Die Cytochrom *o* Oxidase (kodiert durch *cyoABCDE*) besitzt eine geringere Affinität zu Sauerstoff als die Cytochrom *d* Oxidase (kodiert durch *cydAB*). Für das Wachstum unter anaeroben Bedingungen kann die Zelle fünf verschiedene Oxidoreduktasen produzieren und damit eine ganze Reihe von

Elektronenakzeptoren umsetzen. Dabei ist jedes Enzym in der Lage die Oxidation von NADH mit einer Vielzahl von Elektronendonoren über den Quinon Pool zu koppeln. Zwei verschiedene dissimilatorische Nitratreduktasen (kodiert durch *narGHJI* und *narZYWV*) setzen Nitrat zu Nitrit um. Die DMSO Reduktase (kodiert durch *dmsABC*) kann neben Dimethylsulfoxid (DMSO) noch andere Sulfoxide umsetzen. Der TMAO Reduktase (kodiert durch *torCAD*) dienen Trimethylamin- N- Oxid (TMAO) und Amin- N- Oxide als Substrat. Die Reduktion von Fumarat zu Succinat wird durch die Fumarat Reduktase (kodiert durch *frdABCD*) katalysiert. Dieses Enzym ähnelt biochemisch sehr der Succinat Dehydrogenase, die während des aeroben Wachstums verwendet wird und die umgekehrte Reaktion katalysiert. Eine Hierarchie für die Verwendung der unterschiedlichen Substrate durch *E. coli* kann aufgrund der freien Energie, die durch die Reduktion der alternativen Substrate gewonnen wird wie folgt erstellt werden: Sauerstoff > Nitrat > DMSO > TMAO > Fumarat. Wenn mehrere Elektronenakzeptoren vorhanden sind, wird immer der energetisch günstigere vor dem energetisch schlechteren verwendet. Diese Hierarchie wird über die transkriptionelle Regulation durch Sauerstoff und Nitrat beeinflusst. Nur das Cytochrom *o* Oxidase Operon wird optimal unter sauerstoffreichen Bedingungen exprimiert. Die Expression der Cytochrom *d* Oxidase ist unter microaerophilen und die der Gene *narGHJI*, *dmsABC* und *frdABCD* unter anaeroben Bedingungen begünstigt. Die Expression der verschiedenen anaeroben Systeme wird durch Nitrat kontrolliert. Nitrat stimuliert die Synthese der Nitrat Reduktase und unterdrückt die Bildung von DMSO/TMAO Reduktase und Fumarat Reduktase, welche wiederum nur bei Abwesenheit von Nitrat verstärkt exprimiert werden. Ohne diese alternativen anaeroben Elektronenakzeptoren geht die Zelle zur gemischten Säuregärung über.

Die transkriptionelle Regulation durch Sauerstoff wird über FNR und das Zweikomponentensystem ArcA/B vermittelt. In Folge von Anaerobiose aktiviert FNR die Expression von z.B. *narGHJI*, *nirB* (Nitrit Reduktase), *dmsABC* und *frdABCD*. FNR arbeitet ebenfalls als Repressor von *cyoABCDE*, *cydAB* und *sdhCDAB* (Succinat Dehydrogenase). Anaerober Stress in der aeroben Atmungskette oder die Akkumulation von Fermentationsintermediaten und -produkten verursacht durch anaerobe Bedingungen werden durch das membranständige ArcB detektiert und an ArcA weitergeleitet. ArcA arbeitet als anaerober Repressor von Genen für aerobe Enzyme, z.B. des Zitratzyklus und des Glyoxylatzyklus, und aktiviert die Genexpression der Cytochrom *d* Oxidase, welche anaerob ebenfalls unter repressiver Kontrolle von FNR steht. Für die Expression der

Cytochrom *o* Oxidase dienen FNR und ArcA beide als Repressor unter anaeroben Bedingungen.

Die transkriptionelle Regulation durch Nitrat wird über NarX/L und NarP/Q vermittelt, wobei es sich ebenfalls um Zweikomponentensysteme, bestehend aus einer membranständigen Sensorkinase (NarX, NarQ) und einem zytoplasmatischen Regulator (NarL, NarP), handelt. Nitrat und Nitrit werden durch NarX und NarQ detektiert, welche wiederum die Aktivität von NarL und NarP kontrollieren. NarL und NarP aktivieren die Expression von Genen für die Umsetzung von Nitrat und Nitrit und reprimieren anaerobe Systeme wie die Fumarat Reduktase oder Gene die für die Fermentation benötigt werden.

E. coli bildet drei verschiedene Quinone: Ubiquinon (UQ) und die Naphtoquinone Menaquinon (MQ) und Demethylmenaquinon (DMQ). Ubiquinon ist das Hauptquinon bei aerobem Wachstum und wird durch Menaquinon bei anaerobem Wachstum auf DMSO oder Fumarat ersetzt. Bei Wachstum auf Nitrat wird DMQ verwendet.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Bisher existieren sehr unterschiedliche und auch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Beteiligung von Metallen an dem durch HemF katalysierten Enzymmechanismus. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das rekombinant hergestellte Enzym HemF mit Hilfe eines Aktivitätstestsystems sowie mit biophysikalischen Methoden charakterisiert werden. Dabei sollte auch unter Verwendung von bereits hergestellten HemF Varianten die Funktion von Metallen und Sauerstoff bei der Enzymkatalyse geklärt und ein Enzymmechanismus abgeleitet werden. Weiterhin bestand das Ziel HemF zu kristallisieren, um anschließend eine Röntgenstruktur ableiten zu können.

Der während der Tetrapyrrol Biosynthese folgende Katalyseschritt, die Oxidation von Protoporphyrinogen IX, war ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Während das eukaryotische sauerstoffabhängige Enzym gut charakterisiert ist, existiert bei den Prokaryoten ein bis dato noch völlig unbekanntes Enzymsystem, das ohne Beteiligung von Sauerstoff arbeitet. Hierfür sollte zunächst ein Aktivitätstestsystem, basierend auf Zellextrakt, von *E. coli* etabliert und anschließend die sauerstoffunabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase gereinigt werden. Die durch eine mögliche Kopplung bedingte Beteiligung von Enzymen der Atmungskette an der Katalyse sollte untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Atomabsorptions - Spektrometer	Model 3100 Spectrometer	Perkin Elmer
Agarosegelelektrophorese - Apparatur	Agagel	Biometra
Anaerobes Zelt		COY Laboratory Products Inc.
Autoklav	LVSY 50/70	Zirbus
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	BioRad
French Press	French ^R Pressure Cell	SLM Aminco
Geldokumentationsanlage	GelDoc	BioRad
Konzentrationszellen	amicon 8010	Milipore
	amicon 8050	Milipore
Lumineszenzspektrometer	LS50B	Perkin Elmer
pH - Messgerät	pH-Meter C 6840 B	Schott
Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia
SDS-PAGE - Apparatur	Mini Protean II	BioRad
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc
Thermocycler	Tpersonal	Biometra
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallgerät	UW 2070	Bandelin
UV/VIS - Spektrometer	Lambda 2	Perkin Elmer
Videodokumentationsanlage	Chemidoc	BioRad
Waagen	SBA 52	Mettler
	HC 52	Infoors Hat
Zentrifugen	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
	Centrifuge 5403 C	Eppendorf
	Minispin	Eppendorf
	RC 5B Plus	Sorvall
	L8 70M Ultrazentrifuge	Beckmann
	Speedvac Concentrator	Savant

3.1.2 Chemikalien und Kits

Acrylamidstammlösung, Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth
Centricon-10	Amicon
DNA-Isolierungs-Säulen	Quiagen
Kulturmedien	Difco
Markerproteine für SDS-PAGE	Sigma
Molekularbiologische Enzyme	Amersham Biosciences
Oligonucleotide	MWG-Biotech AG
QuickChange™ Mutagenesis Kit	Stratagene
Proteaseinhibitor, Complete Mini, EDTA-frei	Roche
Sterilfilter	Millipore
Ultrafiltrationszelle	Amicon
Wachstumsmedien	Difco

Die hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen und in der Qualität *p. a.* benutzt: Fluka, Gerbu, J.T.Baker, Merck, Roth und Sigma.

3.2 Bakterienstämme und Plasmide

3.2.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> Stamm	Genotyp	Quelle
DH5α	F ⁻ 1 ^{sup} E44D(<i>argF-lac</i>) U169 j80 <i>dlacZ</i> DM15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
BL21(λDE3)	F ⁻ <i>ompZ r⁻m⁻ λ_{lys}PlacUV5-T7-GenlPlac^q-lacI</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
BL21(λDE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm λ(DE3) pLysS</i> (Cam ^R)	Stratagene
BL21CodonPlus™	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3)</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990

(DE3)-RIL	<i>endA</i> Hte[<i>argU ileY leuW</i> Cam ^R]	
DW35	<i>Zjd::Tn10Δ(frdABCD)18 sdhC::Kan</i> <i>araD139Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1</i> <i>flbB5301 deoC1 pfsF25 rbsR</i>	Westenberg <i>et al.</i> , 1993
SASX38	<i>hemG38</i> Mutation in Hfr Cavalli	Sasarman <i>et al.</i> , 1979

3.2.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pCal-n	Expressionsvektor, N-terminaler CBP-tag,	Stratagene
pCalhemF	pCal-n-Derivat, kodiert N-terminale Fusion von CBP mit HemF aus <i>E. coli</i>	Esther Mahlitz, Doktorarbeit
pCalhemFH96L	pCalhemF-Derivat, das ein HemF-Protein mit dem Aminosäureaustausch His 96 gegen Leu kodiert	Esther Mahlitz, Doktorarbeit
pCalhemFH106L	pCalhemF-Derivat, das ein HemF-Protein mit dem Aminosäureaustausch His 106 gegen Leu kodiert	Anselm Sauerwald, Diplomarbeit
pCalhemFH145L	pCalhemF-Derivat, das ein HemF-Protein mit dem Aminosäureaustausch His 145 gegen Leu kodiert	Anselm Sauerwald, Diplomarbeit
pCalhemFH175L	pCalhemF-Derivat, das ein HemF-Protein mit dem Aminosäureaustausch His 175 gegen Leu kodiert	Anselm Sauerwald, Diplomarbeit
pET-22b(+)	Expressionsvektor, C-terminaler His ₆ -Tag	Novagen
pET-22bhemFTE	pET-22b(+)-Derivat, kodiert C-terminale Fusion von His ₆ mit HemF aus <i>T. elongatus</i>	diese Arbeit
pH3	Kodiert für die Untereinheiten A, B, C und D der Fumarat Reduktase (<i>frdA⁺B⁺C⁺D⁺</i> Amp ^r)	Blaut <i>et al.</i> , 1989

3.3 Medien und Medienzusätze

3.3.1 Medien

Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

Hefe-Extrakt	5,0	g/l
NaCl	10,0	g/l
Protease-Pepton	10,0	g/l

Terrific Broth (TB) (Sambrook *et al.*, 1989)

Protease-Pepton	20,0	g/l
Hefe-Extrakt	24,0	g/l
KH ₂ PO ₄	2,31	g/l
K ₂ HPO ₄	12,54	g/l
Thiamin	50,0	g/l
Casaminoacids	0,125	g/l
Glucose	2,0	g/l
Spurenelemente-Lsg.	0,1	% (v/v)
Zusätze:		
Na-Fumarat	6,0	g/l
Nitrat		

Spurenelemente-Lsg.

ZnSO ₄	38,0	mM
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	18,0	mM
MnCl ₄ x 4 H ₂ O	10,0	mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,8	mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,5	mM
B(OH) ₃	2,0	mM
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	5,0	mM

Glycerol - Fumarat - Medium (Luna-Chavez *et al.*, 2000)

KH ₂ PO ₄	5,44	g/l
K ₂ HPO ₄	10,49	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05	g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,125	mg/l
CaCl ₂	0,5	mg/l
Glucose	2,0	g/l
Glycerin	40,0	mM
Casaminoacids	0,5	g/l
Protease-Peptone	2,0	g/l
Hefe	1,0	g/l
Na-Fumarat	6,4	g/l

3.3.2 Medienzusätze

Zusätze wurden als konzentrierte Stammlösungen in Wasser oder Ethanol angesetzt, sterilfiltriert und jeweils unter sterilen Bedingungen dem autoklavierten Medium zugesetzt.

Die verwendeten Endkonzentrationen waren:

Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml
IPTG	250 µM

Agar - Platten wurde vor dem Autoklavieren Agar-Agar zu dem LB - Medium gegeben.

Agar-Agar	15 g/l
-----------	--------

Zur Herstellung einer Hemin Stammlösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml wurden 200 mg Hemin in 50 ml 10% Tween 80 aufgenommen und durch Zugabe von 15 Tropfen 5 N NaOH gelöst. Die verwendete Endkonzentration im Medium betrug 40 µg/ml.

3.4 Mikrobiologische Techniken

3.4.1 Sterilisation

Alle Medien und Puffer wurden bei 121 °C für 20 min dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen und Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße des Filters war 0,2 µm).

3.4.2 Wachstumsbedingungen

3.4.2.1 Aerobe Zellzucht

E. coli Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in Reagenzgläsern kultiviert. Aerobe Bakterienkulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm im Schikane-Kolben kultiviert. Inkubationszeiten bis zur Induktion mittels IPTG wurden abhängig von der Zelldichte variiert.

3.4.2.2 Anaerobe Zellzucht

Anaerobe *E. coli* Kulturen wurden bei 37 °C und 100 rpm in dicht geschlossen Flaschen inkubiert. Eine 100 ml Vorkultur wurde mit *E. coli* Zellen unter aeroben Bedingungen beimpft. Diese Vorkultur anaerobisierte durch Veratmen des restlichen Sauerstoffs in wenigen Minuten während des Zellwachstums. Die Hauptkultur wurde mit 10 ml dieser Vorkultur beimpft und anaerobisierte sich ebenfalls während der Kultivierung.

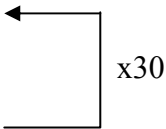
3.4.3 Bestimmung von Zelldichten

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung der OD bei 578 nm im Photometer bestimmt. Bei Zelldichten mit einer $OD_{578} \geq 1$ wurde eine 1:10-Verdünnung vermessen. Eine OD_{578} von 1 entspricht hierbei ca. einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen pro ml.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR-Technik

Mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction)- Technik konnte das *hemF*-Gen direkt aus chromosomaler DNA von *Thermosynechococcus elongatus*, welche freundlicherweise von Diana Kirilovsky (CEA, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde, mit Standardmethoden (White, 1993) amplifiziert werden. Die PCR wurde in PCR-Reaktionsgefäßen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1)	5 min	95°C	
2)	1 min	95°C	
3)	1 min	55°C	
4)	2 min	72°C	
5)	10 min	72°C	

Pro 100 µl Reaktionsansatz wurden etwa 1 µg chromosomale *T. elongatus* DNA, 10 µl 10fach PCR-Puffer (Amersham Biosciences), je 20 pmol Primer, 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 2,5 Units Taq-DNA-Polymerase eingesetzt.

Primer:

pET-22b(+) fw: 5'-GCAAGCGCATATGGACACTA-3'

pET-22b(+) rev: 5'-GTCTTAGGGGGAAGCTTGAC-3'

(Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.)

3.5.2 Restriktion von DNA

Das Spalten von DNA - Doppelsträngen erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angabe der Vertreiberfirma. Die Inkubationsdauer bei 37 °C betrug 1 h.

Restriktionsendonukleasen:

pET-22b(+): *NdeI*
 HindIII

3.5.3 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit T4-DNA-Ligase (1 Unit pro 10 µl Ansatz). Um ein DNA-Fragment (Insert) in einen passenden linearisierten Vektor zu ligieren wurde der Vektor vorher mit SAP (shrimp alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Dazu wurden zum linearisierten Vektor 3,5 Units SAP zugesetzt. Nach 30 min Inkubationsdauer bei 37 °C wurde die SAP durch 15 min Erhitzen auf 80 °C vollständig inaktiviert. Die Ligation erfolgte dann nach Angaben des Herstellers bei einem Vektor-DNA:Insert-DNA Stoffmengenverhältnis von 1:1 und 1:5. Die eingesetzten DNA-Mengen lagen zwischen 0,1 µg und 0,5 µg DNA. Der Ligationsansatz wurde bei RT für 4 h inkubiert.

3.5.4 Herstellung elektrokompenter Zellen

E. coli Zellen (DH5α, BL21(λDE3), BL21(λDE3)pLysS und BL21CodonPlus™(DE3)RIL) wurden in 500 ml LB - Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 gezüchtet und dann durch Zentrifugation bei 8000 rpm (SLA-3000-Rotor, Sorvall) für 10 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 40 ml sterilem, 4 °C kaltem, deionisiertem H₂O resuspendiert, in ein 50 ml Plastik-Röhrchen überführt und nochmals für 5 min bei 5000 rpm (SLA-3000- Rotor, Sorvall) und 4 °C zentrifugiert. Die letzten drei Schritte wurden noch einmal wiederholt. Das Sediment wurde in 4 °C kalter, steriler 10 %iger (v/v) Glycerinlösung in Wasser resuspendiert und für 5 min bei 5000 rpm (SLA-3000-Rotor, Sorvall) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Bakterien-Sediment wurde in einem Volumenteil, bezogen auf das Sedimentvolumen, 10 %-iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu je 40 µl portioniert und bei –80 °C schockgefroren.

3.5.5 Transformation von Bakterien

E. coli Zellen wurden mittels Elektroporation transformiert. Die Elektroporation wurde durchgeführt wie bei Dower *et al.* (1988) beschrieben. Die Zellen wurden dazu mit 1 – 2 µl DNA - Lösung (0,1 – 1 µg/µl) versetzt und in eine Elektroporationsküvette

gegeben. In einem Gene Pulser™ wurden sie durch einen kurzen Spannungsimpuls für die DNA permeabel gemacht.

Am Gene Pulser™ wurden folgende Einstellungen gewählt:

Kapazität	25,0 μ F
Spannung	2,5 kV
Widerstand	200,0 Ω

Die Dauer des Impulses lag zwischen 10 und 40 ms.

Es wurden 10 μ l von der aus dem Transformationsverfahren erhaltenen Zellsuspension auf LB-Agar-Platten (100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert.

3.5.6 Plasmid-DNA - Präparation

Es wurden Plasmid - Präparationen aus 3 ml Kulturansätzen durchgeführt (Minipräp). Die Kulturlösung wurde in zwei sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert (Minispinn, Eppendorf) und der Überstand verworfen. Das Sediment löste man in 300 μ l Puffer P1 und gab 300 μ l Puffer P2 hinzu. Zur Vervollständigung der alkalischen Lyse der Zellen wurde die Lösung 5 min bei RT geschwenkt. Zur Protein- und RNA- Fällung wurden 300 μ l Puffer P3 zugegeben, erneut 5 min bei RT geschwenkt und 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert (Minispinn, Eppendorf). 800 μ l des Überstands wurden vorsichtig abgenommen, erneut zentrifugiert und nach Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei RT mit 560 μ l (0,7 Volumenteile) 100 % Isopropanol versetzt. Man zentrifugierte die so gefällten Nukleinsäuren für 30 min bei 15000 rpm (Minispinn, Eppendorf) ab und wusch das Sediment mit 500 μ l 70%-iger Ethanollösung bei 4 °C. Nach erneuter Zentrifugation wurde die isolierte DNA über Nacht luftgetrocknet und abschließend in 50 μ l sterilem deionisiertem Wasser gelöst

Puffer P1	Tris-HCl (pH = 8.0)	50,0	mM
	EDTA	10,0	mM
	RNase A	0,01	% (w/v)
Puffer P2	NaOH	200,0	mM
	SDS	1,0	% (w/v)

Puffer P3	Kaliumacetat (pH = 5,5) mit Essigsäure titriert	3,0 mM
-----------	--	--------

3.5.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit einer DNA - Lösung wurde mittels vergleichender Bestimmung der Absorption bei 260, 280 und 320 nm durch ein Ultrospec 2000-Photometer ermittelt. Bei einem Faktor von ca. 1,9 zwischen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ kann die DNA als rein betrachtet werden. OD₂₆₀ = 1,0 wurde einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml gleichgesetzt (Sambrock, *et al.*, 1989).

3.5.8 Agarose - Gelelektrophorese

Zur analytischen Trennung von DNA wurden 1 %ige Agarosegele (7,0 cm x 8,2 cm x 0,7 cm) verwendet. Geräteeinstellungen waren 75 V, 120 mA und 60 min Laufdauer. Als Längenvergleich diente der Standard Generuler DNA Laddermix der Firma NEB. Die Nucleinsäuren wurden nach 10 min Inkubation des Gels in Ethidiumbromid - Lösung durch Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 312 nm detektiert.

TAE-Puffer	Tris-Acetat (pH 8,0)	40,0 mM
	EDTA	1,0 mM
Agarosegel	Agarose in TAE-Puffer	1,0 % (w/v)
Probenpuffer	Bromphenolblau	350,0 µM
	Xylen Cyanol FF	450,0 µM
	Orange G	0,25 % (w/v)
	Saccharose in Wasser	115,0 mM
Ethidiumbromidlösung	in Wasser	0,1 % (w/v)

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Rekombinante Darstellung von *Escherichia coli* HemF

3.6.1.1 Rekombinante Proteinsynthese

Das zur Produktion der rekombinanten sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase aus *E. coli* eingesetzte Plasmid pCAL*hemF* kodiert HemF als N-terminales Fusionsprotein mit dem CBP. Die Expression von *hemF* wird durch einen IPTG induzierbaren *lac*-Promotor kontrolliert. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin. Exprimiert wurde im proteasedefizienten *E. coli* Stamm BL21(λ DE3). Alle HemF Varianten wurden mittels des gleichen Systems produziert.

3.6.1.2 Zellkultivierung

In 1 l - Kolben wurde 500 ml dampfsterilisiertes LB - Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin mit 3 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von ca. 0,8 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von je 250 μ l 1 M IPTG - Lösung (Endkonzentration 0,5 mM IPTG) die Expression der *hemF*-CBP - Genfusion induziert. Die Expression wurde für ca. 16 h bei 25 °C und 200 rpm fortgesetzt. Die Zelldichten erreichten dabei im allgemeinen eine OD₅₇₈ von 3,5 - 7. Die Zellen wurden bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min (SLA-3000-Rotor, Sorvall) zentrifugiert.

3.6.1.3 Zellaufschluss

Je 5 g Zellen wurden in 10 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert und durch Ultraschall (Bandelin Sonoplus, 0,5 s Puls und 0,5 s Pause, 15 min, 70 % Amplitude, Mikrospritze MS 73) aufgeschlossen. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mikroskopisch verifiziert. Die erhaltene Suspension zentrifugierte man für 60 min bei 50000 rpm und 4 °C (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor: Ti 70.1).

Zellaufschlusspuffer	Tris-HCl (pH 8,8)	50,0	mM
	NaCl	200,0	mM
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,0	mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,0	mM
	Imidazol	1,0	mM
	Triton X-100	0,1	% (w/v)

3.6.1.4 Affinitätschromatographie an calmodulinhaltiger Matrix

0,5 ml Calmodulin Affinitätschromatographiematerial wurden in einem 50 ml Polypropylen Reaktionsgefäß zweimal mit 10 ml sterilem deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend durch zweimaliges Waschen mit je 10 ml Bindungspuffer äquilibriert. Das Fusionsprotein wurde durch Zugabe der zytosolischen Fraktion des Zellaufschluss zum äquilibrierten Affinitätsmaterial über Nacht bei 4 °C unter Schütteln bei 100 rpm gebunden. Das Säulenmaterial wurde danach in eine 1 ml Säule überführt und mit 10 ml Bindungspuffer mit einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Das Fusionsprotein wurde mit Elutionspuffer unter Sammeln von 1 ml Fraktionen eluiert und die das Fusionsprotein beinhaltende Fraktionen durch SDS-PAGE verifiziert.

Bindungspuffer	Tris-HCl (pH 8,8)	50,0	mM
	NaCl	200,0	mM
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,0	mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,0	mM
	Imidazol	1,0	mM
	Triton X-100	0,1	% (w/v)
Elutionspuffer	Tris-NaOH (pH 8.0)	50,0	mM
	NaCl	1,0	M
	EGTA	10,0	mM
	Triton X-100	0,1	% (w/v)

3.6.1.5 Affinitätschromatographie an Calmodulin (mit Manganionen und W7)

HemF wurde genauso gereinigt wie oben beschrieben, jedoch war die Pufferzusammensetzung eine andere. Beim Bindungspuffer wurde 4 mM MnCl_2 statt Ca- und Mg-Ionen eingesetzt. Statt des EGTA enthielt der Elutionspuffer 10 mM W7, ein Calmodulin - Inhibitor, der zur Entfaltung des Calmodulins führt und so das Fusionsprotein freisetzt.

3.6.1.6 Protease - Verdaу des Fusionsproteins

Zur Spaltung des Fusionsproteins in CBP und HemF wurde die Proteinlösung (1 mg/ml) zuerst 2 h und dann über Nacht (ca. 14 h) jeweils gegen 250 ml Thrombinspaltungspuffer bei 4 °C dialysiert. Dazu wurden Dialyseschläuche aus regenerierter Zellulose verwendet (Dialyseschlauch Visking, Typ 27/32, Ausschlussgrenze 14000, Roth). Die dialysierte Proteinlösung wurde mit 40 U Thrombin Protease (Amersham Biosciences) je mg Protein versetzt und für 16 h bei 18 °C inkubiert. Der Verlauf des Verdaуs wurde per SDS-PAGE verfolgt. Nach der proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins verblieben N-terminal drei zusätzliche Aminosäurereste an HemF.

Thrombinspaltungspuffer	Tris-HCl (pH 8.8)	50,0	mM
	NaCl	20,0	mM
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5	mM

3.6.1.7 Konzentrierung

Proteinlösungen wurden in einer 50 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon) mit einer YM30 - Membran bei 3×10^5 Pa auf jeweils ca. 10 mg Protein / ml Lösung konzentriert. Proteinlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

3.6.1.8 Anaerobe Proteinreinigung

Die strikt anaerobe Reinigung von rekombinantem HemF wurde genauso wie oben beschrieben unter Schutzgasatmosphäre in einem anaeroben Zelt durchgeführt.

3.6.2 Rekombinante Darstellung von *Thermosynechococcus elongatus* HemF

3.6.2.1 Rekombinante Proteinsynthese

Das zur Produktion der rekombinanten sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase aus *T. elongatus* eingesetzte Plasmid pET22b*hemFTE* kodiert HemF als C-terminales Fusionsprotein mit dem His₆. Die Expression von *hemF* wird durch einen IPTG induzierbaren *lac*-Promotor kontrolliert. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin. Exprimiert wurde im proteasedefizienten *E. coli* Stamm BL21(λDE3)pLysS.

3.6.2.2 Zellkultivierung

In 1 l-Kolben wurden 500 ml dampfsterilisiertes LB - Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit 3 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von ca. 0,8 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von je 250 µl 1M IPTG-Lösung (Endkonzentration 0,5 mM IPTG) die Expression der *hemF*-His₆ - Genfusion induziert. Die Expression wurde für ca. 5 h bei 37 °C und 200 rpm fortgesetzt. Die Zellen wurden bei 5000 rpm und 4°C für 15 min (SLA-3000-Rotor, Sorvall) zentrifugiert.

3.6.2.3 Zellaufschluss

Je 5 g Zellen wurden in 10 ml Puffer A resuspendiert und durch Ultraschall (Bandelin Sonoplus, 0,5 s Puls und 0,5 s Pause, 10 min, 70 % Amplitude, Mikrospritze MS 73) aufgeschlossen. Die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mikroskopisch verifiziert. Die erhaltene Suspension zentrifugierte man für 60 min bei 50000 rpm und 4 °C (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor: Ti 70.1).

Puffer A	Tris-HCl (pH 8,0)	50,0	mM
	NaCl	300,0	mM
	Imidazol	10,0	mM

3.6.2.4 Affinitätschromatographie über HiTrap Chelating HP Säule

Die zytosolische Fraktion des Zellaufschlusses wurde auf eine 5 ml HiTrap Chelating HP Säule (Amersham Biosciences), die zuvor mit Puffer A äquilibriert wurde, mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde die Säule als nächstes mit Puffer A gewaschen. Im Anschluss folgte die Elution der Proteine durch einen linearen Imidazol Gradienten von 10 - 400 mM Imidazol in Puffer B über 50 ml mit 2 ml/min. Die HemF enthaltenden Fraktionen (Fraktionsgröße 2 ml) wurden vereinigt (~10 ml mit ca. 1,3 mg/ml Protein), mit Hilfe der Amicon-Zelle konzentriert (Endkonzentration 3,7 mg/ml) und gegen Puffer C dialysiert.

Puffer B	Tris-HCl (pH 8,0)	50,0	mM
	NaCl	300,0	mM
	Imidazol	400,0	mM
Puffer C	Hepes (pH 8,0)	50,0	mM
	KCl	100,0	mM

3.6.2.5 Gelpermeationschromatographie

Für die weitere Reinigung wurde eine Superdex 200 HR 16/60 Säule ($V_t = 124$ ml, Amersham Biosciences) verwendet. Diese wurde mit Puffer C bei einer Flussrate von 0,5 ml/min äquilibriert, mit der dialysierten und sterilfiltrierten HemF - Lösung beladen und mit Puffer C eluiert.

3.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde durch die Bicinchonin (BCA) - Methode ermittelt. Der BCA - Test beruht auf der purpurnen Farbe des Bicinchoninsäure (BCA) – Cu^+ -Komplexes. Zuerst wird Cu^{2+} durch die Proteine im alkalischen Medium zu Cu^+ reduziert (Biuret-Reaktion). Dann bildet das Cu^+ mit BCA einen wasserlöslichen Farbkomplex, welcher bei 562 nm die stärkste Absorption zeigt. Die Absorption ist linear zur Proteinkonzentration über einen Bereich von 20 – 2000 μg Protein / ml Lösung.

1. Protein (Peptidbindungen) + $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Tetradentat-Cu}^+$ -Komplex
2. $\text{Cu}^+ + \text{BCA} \rightarrow \text{BCA-Cu}^+$ -Komplex (purpurrot, A_{562})

Es wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Die Konzentrationsbestimmung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard diente BSA.

3.6.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Standardmethode nach Laemmli, 1970 durchgeführt. Es wurden Minigele (BioRad) mit einem Acrylamidgehalt von 12 % (Trenngel) bzw. 5 % (Sammelgel) verwendet.

Angaben für ein Minigel:

Acrylamid-Stammlösung	Rotiphorese® Gel (37,5:1), Roth		
	Bisacrylamid	0,8	% (w/v)
Trenngel (12 %ig, w/v)	Acrylamid-Stammlösung	2,0	ml
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)		
	mit 0,4 % (w/v) SDS	1,25	ml
	dest. Wasser	1,75	ml
	APS (10 %)	50,0	µl
	TEMED	5,0	µl
Sammelgel (5 %ig, w/v)	Acrylamid-Stammlösung	500,0	µl
	500 mM Tris-HCl (pH 6,8)		
	mit 0,4 % (w/v) SDS	625,0	µl
	dest. Wasser	1,375	ml
	APS (10 %)	25,0	µl
	TEMED	2,5	µl
Elektrophoresepuffer	Glycin	380,0	mM
	Tris-HCl	50,0	mM
	SDS	0,1	% (w/v)

SDS-Probenpuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	100,0	mM
	Glycerin	40,0	% (v/v)
	β -ME	10,0	% (v/v)
	SDS	3,2	% (w/v)
	Bromphenolblau	0,2	% (w/v)
Färbelösung	Essigsäure	10,0	% (v/v)
	Ethanol	30,0	% (v/v)
	Coomassie Brilliant Blau	0,2	5 % (v/v)
Entfärbelösung	Ethanol	30,0	% (v/v)
	Essigsäure	10,0	% (v/v)

3.6.5 Bestimmung der Aktivität von HemF

3.6.5.1 Prinzip des Enzymtest

HemF katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Coproporphyrinogen III (Coprogen) zu Protoporphyrinogen IX (Protogen). Durch Zugabe der Reaktionsstopplösung Wasserstoffperoxid werden Edukt und Produkt der Reaktion zu Coproporphyrin III (Copro) und Protoporphyrin IX (Proto) oxidiert. Diese Oxidationsprodukte weisen unterschiedliche Fluoreszenzspektren auf, wodurch eine fluorimetrische Detektion sowie eine quantitative Analyse der Reaktion möglich ist. Die Anregungswellenlänge beträgt für Copro und Proto 409 nm, während die Emission von Copro bei 618 nm und die für Proto bei 633 nm erfolgt.

Die Fluorimetereinstellung wurde wie folgt gewählt:

Anregungswellenlänge:	409 nm
Detektionsbereich der Emission:	570 - 680 nm
Scangeschwindigkeit	200 nm/min
Spaltöffnung der Anregungswellenlänge	5 nm
Spaltöffnung der Emissionswellenlänge	5 nm

3.6.5.2 Darstellung des Substrats Coproporphyrinogen III

Das Substrat Coproporphyrinogen III wurde durch Reduktion von Coproporphyrin III (Paesel-lorei) erhalten. Als Versuchsanleitung diente eine modifizierte Vorschrift von Grandchamp und Nordmann (1982): 2,9 mg (4 μ mol) Copro wurden in 3 ml 50 mM KOH unter Stickstoffatmosphäre gelöst und mit 2 g 3 %igem Na-Amalgam reduziert. Es wurde so lange bei RT unter Rühren und Lichtausschluss inkubiert, bis die Lösung entfärbt war. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Glaswolle filtriert, mit Kinetikpuffer auf 10 ml aufgefüllt, 69 mg DTT zugegeben und mit 20 %iger H_3PO_4 ein pH von 7 - 8 eingestellt.

Kinetikpuffer	MES / HCl (pH 6)	50,0	mM
	Triton X-100	0,1	% (w/v)

3.6.5.3 Bedingungen des Enzymtests

Für den Standardenzymtest (Kruse *et al.*, 1995) wurden in einem 500 μ l Ansatz 0,56 μ g (0,33 μ M) rekombinantes, homogenes HemF Enzym und 20 μ M Coprogen in Kinetikpuffer für 30 min bei 37 °C, 900 rpm im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l Stopplösung (30 %iges H_2O_2) beendet. Um eine komplette Oxidation des Edukts und Produkts zu gewährleisten wurde für weitere 30 min bei 37 °C und 900 rpm inkubiert.

Zur Inaktivierung von HemF wurden etwa 60 min vor dem Start der Reaktion mit Coprogen 10 mM EGTA zum Standardenzymtest gegeben und bei 37 °C inkubiert.

Die Untersuchung der HemF Aktivität nach Addition von Metallen erfolgte unter Verwendung des Standardenzymtests. Etwa drei Stunden vor dem Start der Reaktion mit Coprogen wurde der Ansatz mit dem jeweiligen Reagenz versetzt und bei 37 °C inkubiert.

Coprogen-Lösung	Coprogen in Kinetikpuffer	0,4	mM
Stop-Lösung	H_2O_2 in H_2O	30,0	%

3.6.5.4 Anaerober Enzymtest

Die Ansatzgröße und die Konzentrationen waren die selben wie beim aeroben Standardenzymtest beschrieben. Sämtliche Lösungen wurden anaerobisiert und in ein anaerobes Zelt eingeschleust. Unter Schutzgasatmosphäre wurden die Enzymtests durchgeführt.

3.6.6 Nachweis von Wasserstoffperoxid als Produkt der von HemF katalysierten Reaktion

Die Enzymtests wurden wie oben beschrieben durchgeführt ohne die anschließende Addition von Wasserstoffperoxid. Der Nachweis von Wasserstoffperoxid, welches während der Enzymreaktion gebildet wurde, erfolgte unter Verwendung des „Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit“ der Firma Molecular Probes (Niederlande, Leiden).

3.6.7 Herstellung von Membranfraktionen verschiedener *Escherichia coli* Stämme

3.6.7.1 Kultivierung von *E. coli* DW35

50 ml dampfsterilisiertes LB - Medium wurden mit 3 ml Übernachtskultur des Fumarat Reduktase defizienten *E. coli* Stamms DW35 angeimpft und für 6 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurden dann 5 l anaerobes Glycerol - Fumarat - Medium beimpft. Die Zellen wuchsen unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C und 100 rpm Schütteln über Nacht.

3.6.7.2 Kultivierung von *E. coli* DW35/pH3

50 ml dampfsterilisiertes LB - Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 3 ml Übernachtskultur des *E. coli* Stamms DW35/pH3 (mit den Fumarat Reduktase Genen *frdABCD* *in trans* komplementiert) beimpft und für 6 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurden dann 5 l anaerobes Glycerol - Fumarat - Medium mit 35 µg/ml

Ampicillin inokuliert. Die Zellen wuchsen unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C und 100 rpm Schütteln über Nacht.

3.6.7.3 Kultivierung von *E. coli* SASX38

2 l anaerobes, dampfsterilisiertes LB - Medium mit 2 g/l Glucose, 6 g/l Fumarat und 40 µg/ml Hemin wurden mit 20 ml einer anaeroben Übernachtskultur des *E. coli* Stamms SASX38 (*hemG38*) beimpft. Die Zellen wuchsen unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C und 100 rpm Schütteln über Nacht.

3.6.7.4 Kultivierung von *E. coli* BL21(λDE3)

E. coli BL21(λDE3) Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C in TB-Medium für ungefähr 8 h bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 2 kultiviert.

3.6.7.5 Isolierung der Membranfraktionen mittels Zentrifugation

Die Zellen wurden bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min (SLA-3000 Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 40 ml Puffer A mit einer Tablette Proteaseinhibitor (Roche) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über die French Press bei 1200 MP. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 11000 rpm und 4 °C (SS34-Rotor, Sorvall). Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei 42000 rpm, 4 °C für 1h zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor: Ti 70.1). Das Sediment wurde in 30 ml Puffer A resuspendiert und eine Tablette Proteaseinhibitor (Roche) dazugegeben. Nach Wiederholung der letzten beiden Zentrifugationsschritte erhielt man eine dunkelbraune Membranfraktion.

Puffer A	K-Phosphat pH 6,9	100,0	mM
	EDTA	100,0	µM

3.6.8 Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *Escherichia coli*

3.6.8.1 Herstellung eines anaeroben Zellextrakt von *E. coli*

E. coli BL21(λ DE3) Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C in TB-Medium kultiviert. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 2 wurden die Zellen unter anaeroben Bedingungen zentrifugiert, mit Puffer A gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mittels French Press bei 1200 MP aufgeschlossen, die erhaltene Suspension aliquotiert und bei –20 °C eingefroren.

Puffer A	Tris-HCl pH 7,4	50,0	mM
----------	-----------------	------	----

3.6.8.2 Isolierung der Membranfraktion von *E. coli* mittels Sucrose Gradientenzentrifugation

Der Zellextrakt von *E. coli* wurde zunächst unter anaeroben Bedingungen bei 2000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt. Mit Hilfe eines diskontinuierlichen Sucrosegradienten wurde die Membranfraktion von den löslichen Proteinen abgetrennt. Der Gradient setzte sich aus zwei verschiedenen Sucrosekonzentrationen zusammen. Im unteren Teil des Zentrifugenröhrchens befanden sich 4 ml einer 60 %igen und darüber 5 ml einer 20 %igen Sucroslösung. Der Überstand des letzten Zentrifugationsschritts (ca. 4 ml) wurde auf diesen Gradienten gegeben und in der Ultrazentrifuge bei 140000 g und 4 °C für 2 h zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor: SW40TI). Die löslichen Proteine konnten nun aus dem oberen Teil des Gradienten isoliert werden. Die Membranfraktion befand sich zwischen den beiden Sucroseschichten.

20 %ige Sucroslsg.	Tris-HCl pH 7,3	10,0	mM
	MgCl ₂	100,0	mM
	Sucrose	20,0	% (w/v)
60 %ige Sucroslsg.	Tris-HCl pH 7,3	10,0	mM
	MgCl ₂	100,0	mM
	Sucrose	60,0	% (w/v)

3.6.8.3 Solubilisierung der Membranproteine

Um die Proteine aus der Membran herauszulösen wurde die Membranfraktion unter anaeroben Bedingungen mit Solubilisierungspuffer verdünnt. Zur Bestimmung der optimalen Solubilisierungsbedingungen wurden die verschiedenen Detergenzien Triton X100, Tween 80 oder Thesit jeweils in den Konzentrationen 0,3 % (v/v) und 3 % (v/v) zur Membranfraktion gegeben und für 1h bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 40000 rpm, 4 °C für 1 h zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, Rotor: Ti 70.1). Im Überstand befanden sich nun alle solubilisierten und im Sediment alle nichtsolubilisierten Proteine.

Solubilisierungspuffer	Tris-HCl pH 8,0	50,0	mM
	KCl	100,0	mM

3.6.8.4 Chromatographische Reinigung über DEAE Sepharose FF

Die solubilisierten Proteine wurden unter anaeroben Bedingungen gegen Puffer B dialysiert und auf eine 1 ml Tropfsäule (Poly-Prep Column, 0,8 x 4 cm, BioRad) mit DEAE Sepharose FF (Amersham Biosciences), welche mit dem gleichen Puffer äquilibriert wurde, aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 3 ml Puffer B gewaschen und anschließend in Teilschritten mit je 3 ml 100 mM NaCl, 150 mM NaCl, 200 mM NaCl und 500 mM NaCl in Puffer B eluiert.

Puffer B	Tris-HCl pH 8,0	50,0	mM
	Triton X100	0,05	% (v/v)

3.6.8.5 Chromatographische Reinigung über Kationentauscher

Über DEAE Sepharose FF gereinigte Proteinfractionen mit Protogen Oxidase Aktivität wurden ebenfalls unter Schutzgasatmosphäre gegen Puffer C dialysiert und entweder auf eine Tropfsäule (Poly-Prep Column, 0,8 x 4 cm, BioRad) mit dem schwachen Kationentauscher CM Sepharose FF (Amersham Biosciences) oder dem starken Kationentauscher SP Sepharose FF (Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Säulen wurden vorher mit Puffer C äquilibriert. Nach dem Auftrag der Proteine erfolgte ein

Waschschritt mit 3 Säulenvolumen Puffer C und die anschließende Elution der Proteine mit je 3 Säulenvolumen 50 mM NaCl, 500 mM NaCl und 1 M NaCl in Puffer C.

Puffer C	MES-NaOH pH 6,0	50,0	mM
	Triton X100	0,05	% (v/v)

3.6.8.6 Chromatographische Reinigung über Blue Sepharose FF

Über Kationentauscher gereinigte Proteinfraktionen mit Protogen Oxidase Aktivität wurden erneut unter anaeroben Bedingungen gegen Puffer B dialysiert und auf eine ebenfalls mit Puffer B äquilibrierte Tropfsäule (Poly-Prep Column, 0,8 x 4 cm, BioRad) mit Blue Sepharose FF (Amersham Biosciences) aufgetragen. Nach dem Auftrag der Proteine erfolgte ein Waschschritt mit 3 Säulenvolumen Puffer B und die anschließende Elution der Proteine mit je 3 Säulenvolumen 50 mM NaCl, 500 mM NaCl und 1 M NaCl in Puffer B.

3.6.8.7 Dialyse

Umpufferung in die für die jeweiligen Untersuchungsmethoden nötigen Puffer erfolgte durch Dialyse im anaeroben Zelt, wie unter 3.6.1.6 beschrieben. Dabei wurde jeweils dreimal gegen das 100fache der umzupuffernden Proteinlösung dialysiert, was einer Verdünnung der im Ausgangspuffer enthaltenen Kleinmoleküle um den Faktor 1000000 entspricht.

3.6.9 Bestimmung der Aktivität der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase

3.6.9.1 Prinzip des Enzymtest

Die Protoporphyrinogen IX Oxidase katalysiert die Umsetzung von Protoporphyrinogen IX (Protogen) zu Protoporphyrin IX (Proto). Das Produkt dieser Reaktion kann, wie unter 3.6.5.1 beschrieben, fluorimetrisch detektiert werden. Um die

Produktkonzentration der Reaktion zu ermitteln, wurde eine Eichgerade mit verschiedenen Konzentrationen des Protos erstellt (Abb. 10).

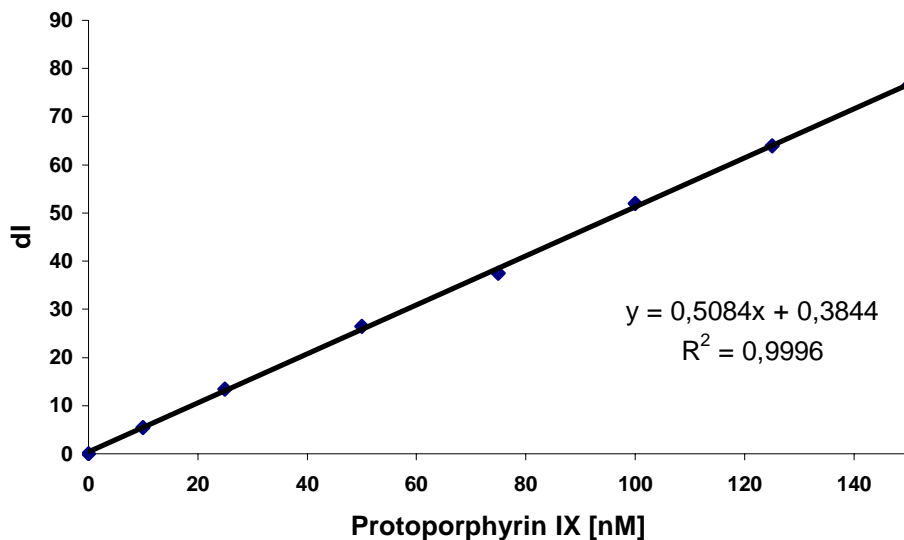


Abbildung 10: Fluoreszenz von Proto in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen (Eichgerade). Protoporphyrin IX wurde in Kinetikpuffer gelöst. Geräteeinstellungen: wie unter 3.6.5.1 beschrieben. Aus der Kalibrierkurve ergaben sich 0,89 Fluoreszenz Intensitätseinheiten pro 1 nM Proto.

3.6.9.2 Darstellung des Substrats Protoporphyrinogen IX

Das Substrat Protoporphyrinogen IX wurde durch Reduktion von Protoporphyrin IX (Sigma) erhalten. Als Versuchsanleitung diente eine modifizierte Vorschrift von Sano und Granick (1961): 0,84 mg (500 μ M) Proto wurden in 3 ml 10 mM KOH, 20 % Ethanol unter Stickstoffatmosphäre gelöst und mit 6 g 3 %igem Na-Amalgam reduziert. Nach einer Inkubation bei 80 °C für max. 3 - 5 min war die Lösung entfärbt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Glaswolle filtriert, 21 mg DTT zugegeben und mit 20 %iger H_3PO_4 ein pH von 8 - 8,8 eingestellt. Das benötigte Protoporphyrin IX wurde immer frisch hergestellt.

3.6.9.3 Bedingungen des Enzymtests

Unter anaeroben Bedingungen wurden in einem 500 μ l Ansatz 50 μ l 10x Enzymtestpuffer, 100 μ l Proteinlösung, 10 mM Fumarat und 10 μ M Protogen

zusammengegeben. Nach dem Start der Reaktion konnte die Bildung von Protoporphyrin IX direkt am Fluorimeter verfolgt werden.

10x Enzymtestpuffer	Tris-HCl pH 7,6	500,0	mM
	EDTA	10,0	mM
	Glutathione	50,0	mM
	Triton X100	3,0	% (v/v)
Protogen-Lösung	Protogen	500,0	µM

3.6.9.4 Addition von verschiedenen Elektronenakzeptoren zum Enzymtest

Die Untersuchung der Protoporphyrinogen IX Oxidase Aktivität erfolgte unter Verwendung des Standardenzymtestsystems (3.6.9.3). Anstelle des Fumarats wurden jeweils die Elektronenakzeptoren Fumarat (10 mM), KNO₃ (10mM), NAD (50 µM; 1 mM), NADP (1 mM), DCIP (2,5 µM), Methylviologen (2,5 µM), Benzylviologen (2,5 µM), Phenanzinmethosulfat (2,5 µM), Methylenblau (2,5 µM), TEMED (2,5 µM; 10 µM), Menadion (2,5 µM), Vitamin K₁ (2,5 µM) und 2, 3, 5- Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM) zum Ansatz gegeben.

3.7 Biophysikalische Methoden

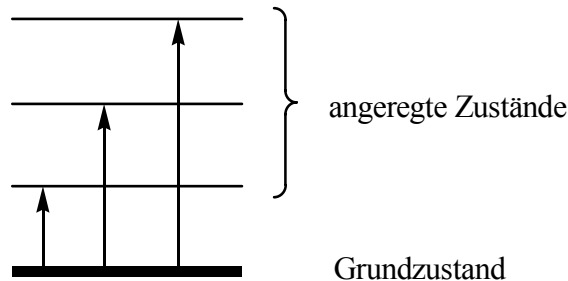
3.7.1 UV-Vis Absorptionsspektroskopie

UV-Vis Absorptionsspektren über den Bereich von 190 bis 730 nm wurden mit Hilfe eines Lambda 2 Spektrometers der Firma PerkinElmer aufgenommen.

3.7.2 Atomabsorptionsspektroskopie

Das Prinzip der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) beruht auf der Anregbarkeit von Atomen durch Zufuhr von definierten Energiemengen. Normalerweise befinden sich Atome im Grundzustand, dem Zustand mit der energieniedrigsten Elektronenkonfiguration. Durch Energiezufuhr (z.B. Licht) können nun die Atome in

angeregte Zustände überführt werden, wobei Elektronen in energetisch höher liegende Niveaus angehoben werden. Da die Energieniveaus der Elektronen definierte Abstände voneinander haben, muss die zugeführte Energiemenge genau einem solchen Abstand entsprechen, damit ein Elektronenübergang stattfinden kann.



Aufgrund der einzigartigen elektronischen Struktur jedes Elements lassen sich die Atome verschiedener Elemente nur durch Licht mit bestimmten, für jedes Element charakteristischen Wellenlängen, anregen.

Bei der Atomabsorptionsspektroskopie wird bestimmt, wieviel Licht einer bestimmten Wellenlänge beim Durchgang durch eine „Atom-Wolke“ absorbiert wird. Mit steigender Anzahl von Atomen nimmt auch die Absorption von Licht zu. Es gilt über einen weiten Bereich das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$A = a \times b \times c$$

A = Absorption

a = Absorptions-Koeffizient

b = Länge des Lichtwegs durch die Probe

c = Konzentration der Probe

Um eine „Atom-Wolke“ zu erzeugen, muss genügend thermische Energie zugeführt werden, so dass Moleküle in Atome zerlegt werden. Dies kann u.a. in einer Flamme geschehen. Bei den richtigen Bedingungen bleiben die Atome in der Flamme im Grundzustand und werden erst durch Licht mit entsprechender Wellenlänge angeregt.

Abbildung 11 veranschaulicht noch einmal das Prinzip der Flammen-AAS.

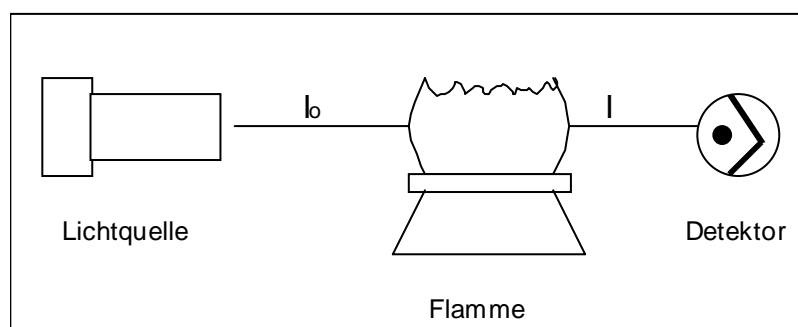


Abbildung 11: Prinzip der Flammen-AAS.

Licht einer charakteristischen Wellenlänge der Intensität I_0 trifft auf die Atome in der Flamme. Diese absorbieren Licht und je nach Anzahl der vorhandenen Atome tritt Licht mit verminderter Intensität I auf einem Detektor auf.

Für die Absorption gilt: $A = \log(I_0/I)$ und $A = a \times b \times c$

Der direkt proportionale Zusammenhang zwischen Absorption und Atomkonzentration ermöglicht das Aufnehmen von Kalibrierkurven mit verschiedenen Standardlösungen bekannter Konzentration. Die Konzentration einer unbekannten Lösung kann dann aus einer solchen Kurve abgelesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mangangehalt von Proteinlösungen mittels AAS bestimmt. Die Absorptionswellenlänge betrug 279,3 nm. Es wurde eine Luft/Acetylen-Flamme (oxidierend, mager, blau) verwendet. Eine Kalibrierkurve mit Manganstandardlösungen (AAS - Standardlösungen von Merck), deren Konzentrationen 0,5 mg/l, 0,2 mg/l und 0,05 mg/l betrugen, wurde aufgenommen und vom Gerät gespeichert, so dass die Konzentrationen des analysierten Metalls in der unbekannten Lösung direkt abgelesen werden konnten. Um das Probenvolumen möglichst klein zu halten und um ähnliche Lösungsmittelbedingungen wie in den Standards zu schaffen, wurde ein Additionsverfahren zur Vermessung der Proben verwendet. Dazu wurden zu 20 µl Proteinlösung je 180 µl der Standardlösungen gegeben und diese Mischung wurde vermessen. Der tatsächliche Mangangehalt der Proben wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung aus der Differenz der Werte der Standards alleine und der Werte der Mischungen berechnet.

3.7.3 Metallbestimmung mittels Elektronenspinresonanz - Spektroskopie (ESR)

Die Elektronenspinresonanz - Spektroskopie ist eine Form von Absorptionsspektroskopie. Man versteht darunter die Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Substanzen, wobei Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus der Elektronenspins induziert werden. Mittels ESR können also Moleküle mit ungepaarten Elektronen, wie z.B. Übergangsmetalle in Proteinen oder freie Radikale, nachgewiesen werden. Die ESR Spektren wurden am Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie in Mülheim an der Ruhr unter freundlicher Mithilfe von PD Dr. Frank Neese aufgenommen und ausgewertet.

3.8 Methoden der Bioinformatik

3.8.1 Datenbanksuche mit den BLAST - Programmen

Analysen von Proteinsequenzen wurden entweder mit Hilfe des Servers des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD) oder des Servers des *Swiss Institute of Bioinformatics* (Geneva, Schweiz) durchgeführt. Vergleiche von Proteinsequenzen mit ähnlichen Sequenzen anderer Organismen wurden mit dem Suchprogramm BLASTP, welches den **BLAST**-Algorithmus verwendet (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool), durchgeführt. Blast beginnt die Suche mit einigen kleinen n-Meren, für die alle gefundenen Einträge mit aussichtsreichen Entsprechungen in die weitere Suche mit aufgenommen werden. Diese n-Mere werden schrittweise verlängert und der Ähnlichkeitsgrad der gelisteten Sequenzen mit der gesuchten Sequenz statistisch bewertet. Das Ergebnis der Suche ist eine Liste mit ähnlichen Sequenzen und der statistischen Signifikanz der Identität. Diese entspricht der Zufälligkeit einer beliebigen Sequenz, mit der Suchsequenz identisch zu sein. Ein Wert von 0 bedeutet Identität und mit steigendem Wert nimmt die Ähnlichkeit ab. Um konservierte Domänen zu identifizieren wird die eingegebene Sequenz mit einer Score - Matrix verglichen, der ein konserviertes Sequenz Alignment zugrunde liegt.

Für Vergleiche von Protein- oder Genomsequenzen mit anderen Bakterien wurde die PRODORIC-Datenbank verwendet (Münch *et al.*, 2003).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase HemF aus *Escherichia coli*

Bisherige Ergebnisse in Bezug auf den Metallgehalt der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase waren sehr kontrovers. Im Rahmen einer vorhergehenden Arbeit konnte der Einfluss von Manganionen auf die Aktivität der CPO aus *E. coli* von Dr. Esther Mahlitz in unserem Labor nachgewiesen werden. Histidin Varianten von HemF besaßen eine verminderte Aktivität (Mahlitz, 2001). Die Bedeutung von Metallionen bei der HemF Katalyse sollte verifiziert und das gebundene Metall nachgewiesen werden. Dabei war die Beteiligung der Histidin Reste an der Koordination des Metalls zu klären. Hinweise auf einen möglichen Enzymmechanismus sollten gefunden werden.

4.1.1 Produktion und Reinigung von *E. coli* HemF und von HemF Varianten

Die Überproduktion von *E. coli* HemF erfolgte mit dem Plasmid pCalhemF im *E. coli* Stamm BL21(λ DE3) als N-terminales CBP-HemF Fusionsprotein. Die Reinigung von HemF erfolgte affinitätschromatographisch am Säulenmaterial Calmodulin Sepharose. Üblicherweise wurde die Reinigung unter Verwendung von Ca^{2+} -Ionen für die Bindung an das Säulenmaterial und EGTA als Metalchelator zum Entfernen der Ionen zur Elution des Proteins durchgeführt. Bereits in der Doktorarbeit von Dr. Esther Mahlitz wurde eine Inaktivierung von HemF durch EGTA beschrieben. Als Ursache dafür wurde das mögliche Vorhandensein von Manganionen im Enzym beschrieben. Deshalb wurde auch in der vorliegenden Arbeit das von Dr. Esther Mahlitz etablierte Reinigungssystem unter Verwendung von Mn^{2+} -Ionen und dem Calmodulin-Inhibitor W7 (N-6(Aminohexyl)-5-chloro-1-naphtalen Sulfonamid HCL) verwendet. Im Anschluss an die Reinigung wurde das CBP (4000 Da) vom Fusionsprotein unter Verwendung von Thrombin proteolytisch abgespalten und mittels Dialyse (Ausschlussvolumen 10 kDa) von HemF getrennt. So erhielt man aus einem Liter Bakterienkultur ca. 1 mg nahezu zu Homogenität gereinigtes HemF (Abb. 12). Das Gleiche galt auch für die Reinigung sämtlicher HemF Varianten.

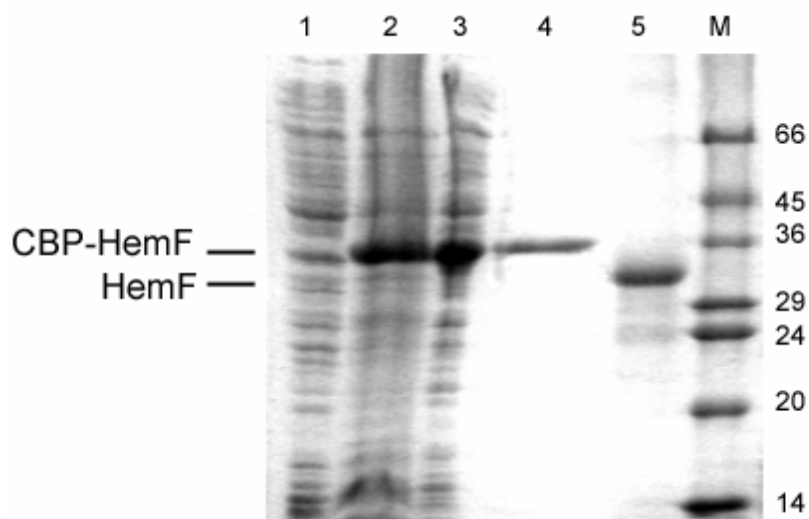


Abbildung 12: Reinigung von rekombinantem *E. coli* HemF. Das 10 %ige Coomassie Brilliant Blau gefärbte SDS-Gel zeigt die Proteine von *E. coli* Zellen vor IPTG-Induktion (Bahn 1), nach IPTG-Induktion der CBP-HemF Genexpression (Bahn 2), die löslichen Proteine nach dem Zellaufschluss (Bahn 3), das affinitätschromatographisch gereinigte CBP-HemF Fusionsprotein (Bahn 4) und das gereinigte HemF nach Abspaltung des CBP. Bahn M zeigt die Proteine des Dalton Mark VII. Die relative Masse ($\times 10^3$) ist angegeben.

4.1.2 Sauerstoff dient bei der HemF Katalyse als Elektronenakzeptor und führt zur Bildung von H_2O_2

Interessanterweise wird die Expression des *HEM 13* Gens von Hefe und des *hemF* Gens von *Pseudomonas aeruginosa*, die beide für sauerstoffabhängige CPOs kodieren, unter anaeroben Wachstumsbedingungen stark induziert (Zagorec *et al.*, 1986; Rompf *et al.*, 1998). Die sauerstoffabhängige Ribonukleotid Reduktase aus *E. coli* benötigt eine aerobe Aktivierung durch Sauerstoff zur Bildung eines Proteinradikals. Nach der Bildung dieses Radikals ist das Enzym unter strikt anaeroben Bedingungen fähig mehrere Runden Substratumsetzung zu katalysieren, was auf der Regeneration des Proteinradikals beruht (Reichard, 2002). In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass die sauerstoffunabhängige CPO HemN ein Enzym ist, das für seine Katalyse ein Radikal durch die homolytische Spaltung von reduziertem S-Adenosylmethionin erzeugt (Layer *et al.*, 2002). Um zu unterscheiden ob dem Sauerstoff eine Funktion bei der Radikalbildung zukommt oder ob er als Elektronenakzeptor dient, wurde gereinigtes rekombinantes HemF unter anaeroben Bedingungen analysiert. Das Enzym wurde strikt anaerob produziert und gereinigt, um den Kontakt zum Sauerstoff zu vermeiden. Dieser Enzympräparation fehlte

die Fähigkeit unter anaeroben Bedingungen die Umsetzung von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX zu katalysieren (Abb. 13; Tab. 3). Sauerstoff ist also essentiell für die von HemF katalysierte Reaktion. Hatte HemF während der rekombinanten Produktion Kontakt zu Sauerstoff und wurde anschließend unter strikt anaeroben Bedingungen gereinigt, dann konnte eine „single turnover“ Umsetzung beobachtet werden (Tab. 3). Das heißt, die Menge an gebildetem Produkt entsprach der Menge an eingesetztem Enzym. Eine zweite Runde Substratumsetzung konnte durch dieses anaerob gereinigte HemF nicht katalysiert werden (Tab. 3).

Mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor, sollte die Bildung von stöchiometrischen Mengen Wasserstoffperoxid während der von HemF katalysierten Reaktion sehr wahrscheinlich sein. Dieser Nachweis gelang unter Verwendung eines Kits, der mit Hilfe des Farbstoffes Amplex Red (Molecular Probes, Niederlande, Leiden) Wasserstoffperoxid als Produkt bei der Umsetzung von Coprogen zu Protogen detektieren konnte.

Die Tatsache, dass während der Enzymreaktion Sauerstoff verbraucht und Wasserstoffperoxid gebildet wurde, bestätigt die Rolle des Sauerstoff als Elektronenakzeptor und macht eine Beteiligung von Sauerstoff an der Bildung eines Enzymradikals unwahrscheinlich.

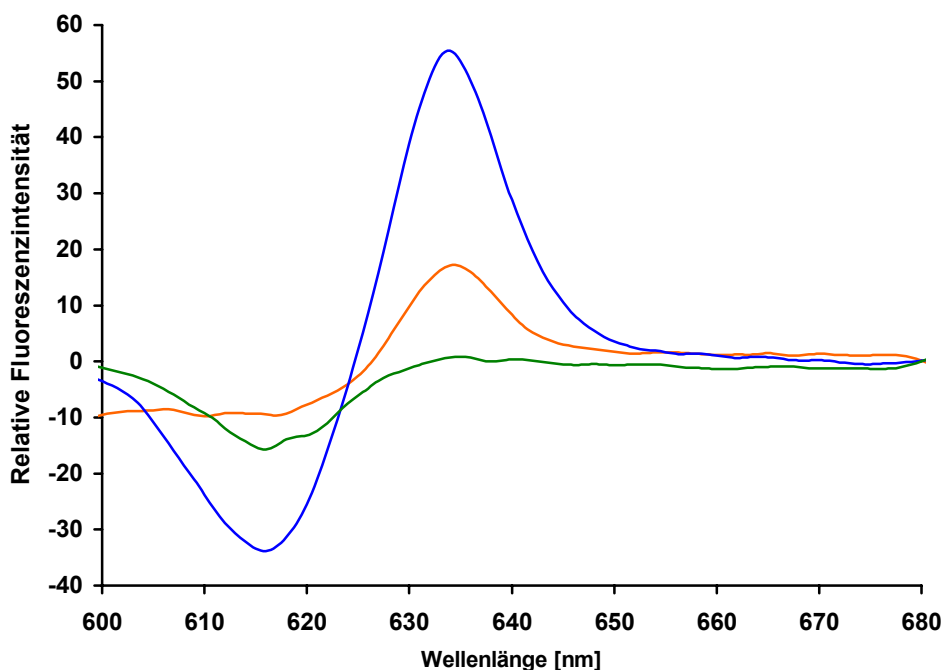


Abbildung 13: Einfluss von Sauerstoff auf die Katalyse von gereinigtem *E. coli* HemF. Es wurden Standardenzymtests, wie in 3.6.5 beschrieben, mit aerob gereinigtem HemF unter aeroben Bedingungen (blau); und mit anaerob gereinigtem HemF aus aerober Zellkultur (rot) und mit anaerob gereinigtem HemF aus anaerober Zellkultur (grün) unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Eine fluorimetrische Detektion des oxidierten Produkts Protoporphyrin IX bei 633 nm ist gezeigt.

Tabelle 3: Abhängigkeit der von HemF katalysierten Reaktion von Sauerstoff.

Vorkultur	Hauptkultur	Proteinreinigung	Enzymtest ^A	Turnover ^B
aerob	aerob	aerob	aerob	21,5
aerob	anaerob	anaerob	anaerob	0,8
anaerob	anaerob	anaerob	anaerob	n.d. ^C

^A Es wurde der Standardenzymtest, wie in **3.6.5** beschrieben, unter aeroben oder strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt.

^B Die Produktbildung wurde über einen Zeitraum von 90 min gemessen. Die Menge an gemessenem Proto wurde zur Menge des eingesetzten HemF ins Verhältnis gesetzt.

^C n.d. = nicht detektierbar

4.1.3 Manganionen sind essentiell für die sauerstoffabhängige HemF Katalyse

Häufig werden in der Natur Metalle zur Aktivierung von molekularem Sauerstoff verwendet. Die Notwendigkeit von Sauerstoff für die von HemF katalysierte Reaktion macht auch hier eine Beteiligung von Metallionen an der Katalyse sinnvoll. Enzymtests unter Verwendung von HemF, welches mit EGTA behandelt wurde, führten zu einem signifikanten Verlust der CPO Aktivität von HemF. Zu diesem Testsystem wurden verschiedene Metallionen in Konzentrationen zwischen 0,25 und 20 mM zugesetzt. Mit einem Maximum bei einer Konzentration von 10 mM konnte nur die Anwesenheit von Manganionen die komplette Enzymaktivität wieder herstellen. Auch Kalziumionen waren in der Lage die Enzymaktivität in einem gewissen Maße zu steigern (Abb. 14; Tab 4). Bei niedrigen Konzentrationen ist die CPO Aktivität mit Manganionen und Kalziumionen ungefähr gleich. Erst bei Konzentrationen ab 5 mM ist ein deutlicher Unterschied und damit auch die Bedeutung des Mangan zu erkennen. Enzymtests, welche mit Mangan- und Kalziumionen in Kombination durchgeführt wurden konnten eine gemeinsame Rolle der beiden Metalle für die Katalyse ausschließen. Bei gleich bleibender Konzentration von Manganionen, entweder 5 oder 10 mM, wurden verschiedene Konzentrationen Kalziumionen zum Enzymtest addiert. Mit steigender Konzentration an Ca^{2+} -Ionen sank die Menge der Mn^{2+} -Ionen und damit auch die Aktivität von HemF (Tab 4). Andere divalente Metallionen einschließlich Kupfer, Eisen, Magnesium, Kobalt, Zink und Nickel konnten das Enzym nach EGTA- Behandlung nicht wieder reaktivieren (Abb 14, Tab 4).

Der Effekt von Metallionen auf die Aktivität der CPO konnte schon in ähnlicher Weise an dem Enzym aus Tabak nachgewiesen werden. Auch hier erzielte die Zugabe von Mangan- oder Kobaltionen eine Steigerung der Enzymaktivität (Hsu *et al.*, 1970). Andere Metallionen, einschließlich der in eukaryontischen HemF gefundenen Fe^{2+} - und Cu^{2+} - Ionen, zeigten auch bei den früher durchgeführten Untersuchungen keinerlei Einfluss auf die Aktivität des Enzyms (Hsu *et al.*, 1970, Yoshinaga *et al.*, 1980a).

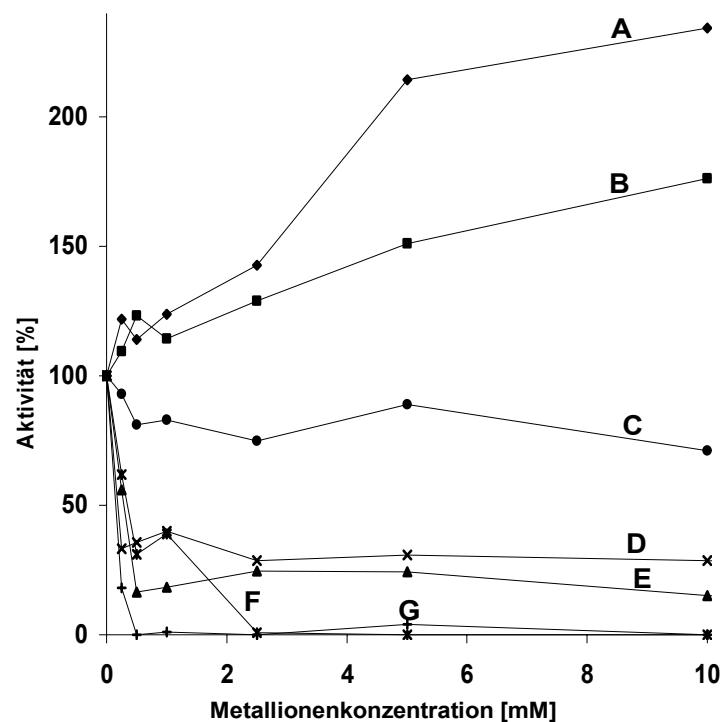


Abbildung 14: Einfluss von verschiedenen divalenten Kationen auf die Enzymaktivität von *E. coli* HemF. Das rekombinante Enzym wurde mit EGTA vorbehandelt, was zu einem Verlust der Enzymaktivität von 80 % führte. Die restliche mit dem Standardenzymtest (3.6.5) gemessene Aktivität wurde dann auf 100 % gesetzt. Ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität konnte nur mit MnCl_2 (A) gemessen werden. Auch CaCl_2 (B) konnte die Aktivität wiederherstellen. MgCl_2 (C), NiCl_2 (D), ZnCl_2 (E), CuCl_2 (F) und FeCl_2 (G) hatten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität von *E. coli* HemF.

Tabelle 4: Einfluss von EGTA und Metallionen auf die Enzymaktivität von *E. coli* HemF

1. Behandlung ^A	Zusatz 1 ^B	Zusatz 2 ^B	HemF Aktivität ^C [%]
-	-	-	42
-	10 mM MnCl ₂	-	100
10 mM EGTA	-	-	16
10 mM EGTA	10 mM CoCl ₂	-	15
10 mM EGTA	10 mM NiCl ₂	-	14
10 mM EGTA	10 mM ZnCl ₂	-	6
10 mM EGTA	10 mM FeCl ₂	-	15
10 mM EGTA	10 mM MgCl ₂	-	12
10 mM EGTA	10 mM AlCl ₃	-	11
10 mM EGTA	10 mM CuCl ₂	-	34
10 mM EGTA	10 mM CaCl ₂	-	75
10 mM EGTA	1 mM MnCl ₂	-	60
10 mM EGTA	10 mM MnCl ₂	-	100
10 mM EGTA	10 mM MnCl ₂	0,25 mM CaCl ₂	72
10 mM EGTA	10 mM MnCl ₂	1 mM CaCl ₂	57
10 mM EGTA	10 mM MnCl ₂	5 mM CaCl ₂	63
10 mM EGTA	10 mM MnCl ₂	20 mM CaCl ₂	52
10 mM EGTA	5 mM MnCl ₂	0 mM CaCl ₂	91
10 mM EGTA	5 mM MnCl ₂	0,25 mM CaCl ₂	59
10 mM EGTA	5 mM MnCl ₂	1 mM CaCl ₂	58
10 mM EGTA	5 mM MnCl ₂	5 mM CaCl ₂	60
10 mM EGTA	5 mM MnCl ₂	20 mM CaCl ₂	50

^AGereinigtes rekombinantes HemF wurde mit EGTA für 60 min bei 37 °C inkubiert.

^BDer Standardenzymtest wurde nach 3 h Inkubation mit den Zusätzen, wie unter **3.6.5** beschrieben, durchgeführt.

^CDas nach MnCl₂ - Behandlung voll aktive Enzym wurde auf 100 % gesetzt. Alle anderen Aktivitäten wurden darauf bezogen.

4.1.4 Nachweis der Manganbindung an HemF und daran beteiligte Histidine

Neben dem Wildtypenzym wurden auch die von Dr. Esther Mahlitz erzeugten HemF Varianten mit dem Aminosäureaustausch H96L, H106L, H145L und H175L gereinigt und biochemisch charakterisiert. Diese Aminosäurereste sind hoch konserviert (Abb. 15) und wurden bereits als essentiell für die von HemF katalysierte Reaktion beschrieben. Alle Varianten besitzen keine CPO Aktivität. Die essentiellen Histidin Reste könnten bei der Manganbindung oder an anderen wichtigen katalytischen Prozessen beteiligt sein.

<i>E. coli</i>	34	DSWRRKCCGGGSSVLRNCGVFEKAGVNFSEWHCK ₂ GVSLVWHHPNPVPTSHANVRFFIARPPCAEPV...DWFGCCFDLTP
<i>H. sapiens</i>	79	DRWRRKCCGGGSSVLRNCGVFEKAGVNFSEWHCK ₂ GVSSVWHHPNPVPTSHANVRFFIARPPCAEPV...DGNKQWFFCGGCDLTP
<i>M. musculus</i>	79	DRWRRKCCGGGSSVLRNCGVFEKAGVNFSEWHCK ₂ GVSSVWHHPNPVPTSHANVRFFIARPPCAEPV...DGNTHWFFCGGCDLTP
<i>N. tabacum</i>	121	DVWRRKCCGGGSSVLRNCGVFEKAGVNFSEWHCK ₂ GVSSVWHHPNPVPTSHANVRFFIARPPCAEPV...DWFGCCFDLTP
<i>A. thaliana</i>	111	DVWRRKCCGGGSSVLRNCGVFEKAGVNFSEWHCK ₂ GVSSVWHHPNPVPTSHANVRFFIARPPCAEPV...DWFGCCFDLTP
<i>T. elongatus</i>	60	DTWRRKCCGGGSSVLRNCGVFEKAGVNFSEWHCK ₂ GVSSVWHHPNPVPTSHANVRFFIARPPCAEPV...DWFGCCFDLTP
<i>P. aeruginosa</i>	35	DVWRRKCCGGGSSVLRNCGVFEKAGVNFSEWHCK ₂ GVSSVWHHPNPVPTSHANVRFFIARPPCAEPV...DWFGCCFDLTP
<i>E. coli</i>	134	FYCFEEDAVHFFHTLRACDQHGCDLYPRFKKWCDDYFYFHKHNEORCGIGCFFD...DLNTPDFDHCFAFMQAVCKGYDAYLPI
<i>H. sapiens</i>	187	TYLNQEDAVHFFHTLRACDQHGCDLYPRFKKWCDDYFYFHKHNEORCGIGCFFD...DLDSPSREERFVQSCARAVVPSSTPL
<i>M. musculus</i>	187	RYLNQEDAVHFFHTLRACDQHGCDLYPRFKKWCDDYFYFHKHNEORCGIGCFFD...DLDSPSREERFVQSCARAVVPSSTPL
<i>N. tabacum</i>	231	AYTFEEDVHFFHTLRACDQHGCDLYPRFKKWCDDYFYFHKHNEORCGIGCFFD...DENDYDQWMLLSFSTECANSVVPTAPI
<i>A. thaliana</i>	220	AYTFEEDVHFFHTLRACDQHGCDLYPRFKKWCDDYFYFHKHNEORCGIGCFFD...DENDYDQWMLLSFSTECANSVVPTAPI
<i>T. elongatus</i>	155	YYTFEEDVHFFHTLRACDQHGCDLYPRFKKWCDDYFYFHKHNEORCGIGCFFD...SIGSRSDQDLFAFIQSCQGFLEATLPI
<i>P. aeruginosa</i>	135	YYTFEEDVHFFHTLRACDQHGCDLYPRFKKWCDDYFYFHKHNEORCGIGCFFD...DLNMQWDFDTCFAFIQSCQGFLEATLPI
<i>E. coli</i>	217	VEREKAMAYCEREENFOLYRRCRYVEFNLVDRCITFLCLQTGCRITESILMSPLVWWEYDYCKDCSPEALSEFIRWPDWV
<i>H. sapiens</i>	269	VEREKAMAYCEREENFOLYRRCRYVEFNLVDRCITFLCLQTGCRITESILMSPLVWWEYDYCKDCSPEALSEFIRWPDWV
<i>M. musculus</i>	269	VEREKAMAYCEREENFOLYRRCRYVEFNLVDRCITFLCLQTGCRITESILMSPLVWWEYDYCKDCSPEALSEFIRWPDWV
<i>N. tabacum</i>	314	VEKEKDEFTDQKAWQQLRRGRYVEFNLVDRCITFLCLQTGCRITESILMSPLVWWEYDYCKDCSPEALSEFIRWPDWV
<i>A. thaliana</i>	303	VEKEKDEFTDQKAWQQLRRGRYVEFNLVDRCITFLCLQTGCRITESILMSPLVWWEYDYCKDCSPEALSEFIRWPDWV
<i>T. elongatus</i>	266	VEREKAMAYCEREENFOLYRRCRYVEFNLVDRCITFLCLQTGCRITESILMSPLVWWEYDYCKDCSPEALSEFIRWPDWV
<i>P. aeruginosa</i>	218	VEREKAMAYCEREENFOLYRRCRYVEFNLVDRCITFLCLQTGCRITESILMSPLVWWEYDYCKDCSPEALSEFIRWPDWV

Abbildung 15: Aminosäuresequenzvergleich der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidasen aus *E. coli*, *H. sapiens*, *M. musculus*, *N. tabacum*, *A. thaliana*, *T. elongatus* und *P. aeruginosa*. Rot unterlegt sind die gegen Lysin ausgetauschten Histidinreste H96, H106, H145 und H175.

4.1.4.1 Atomabsorptionsspektroskopie

Der Metallgehalt des Wildtypenzym und der vier Varianten wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie untersucht. Es wurden keine signifikanten Mengen an Eisen, Kalzium oder Kupfer gefunden. Aufgrund des nicht vollständigen Einbaus von Mangan in das Wildtyp HemF, was durch die starke Stimulation der Enzymaktivität nach Addition von Manganionen angezeigt wird, konnten nur 0,2 bis 0,6 mol Mangan/mol HemF gemessen werden. Im Gegensatz dazu enthielt das mutierte HemF-H106L keine detektierbare Menge und HemF-H96L eine reduzierte Menge an Mangan. Der Mangangehalt von HemF-H145L und HemF-H175L variierte zwischen verschiedenen

Präparationen innerhalb eines Bereichs von 0,04 bis 0,4 mol Mangan/mol Untereinheit (H145L) und von 0,005 bis 0,5 mol Mangan/mol Untereinheit (H175L).

4.1.4.2 Elektronenspinresonanz - Spektroskopie

Die mögliche Bindung von Mangan an HemF sowie die Beteiligung der Histidinreste daran sollte mittels Elektronenspinresonanz - Spektroskopie verifiziert werden. Zur Messung der Spektren wurden ca. 100 μ M des rekombinant gereinigten HemF, sowie der Varianten HemF-H106L, HemF-H145L und HemF-H175L eingesetzt. Das Wildtypenzym (Abb. 16; 17 A) und das mutierte Enzym HemF-H145L (Abb. 17 F) zeigten beide ein typisches Manganspektrum, welches charakteristisch für ein Mn(II) Monomer ist. Als Kontrolle wurde ebenfalls das Spektrum des Puffers aufgenommen (Abb. 17 B). Das Fehlen eines typischen Manganspektrums in dieser Probe, diente als Beweis für die Bindung der gemessenen Manganionen an das Enzym. Mit EGTA behandeltes HemF zeigte keine und eine mit EGTA behandelte und anschließend mit MnCl_2 rekonstituierte Probe zeigte schwache Signale (Abb. 17 C, D). Die beiden Varianten HemF-H106L und HemF-H175L wiesen kein Manganspektrum auf (Abb. 17 E, F).

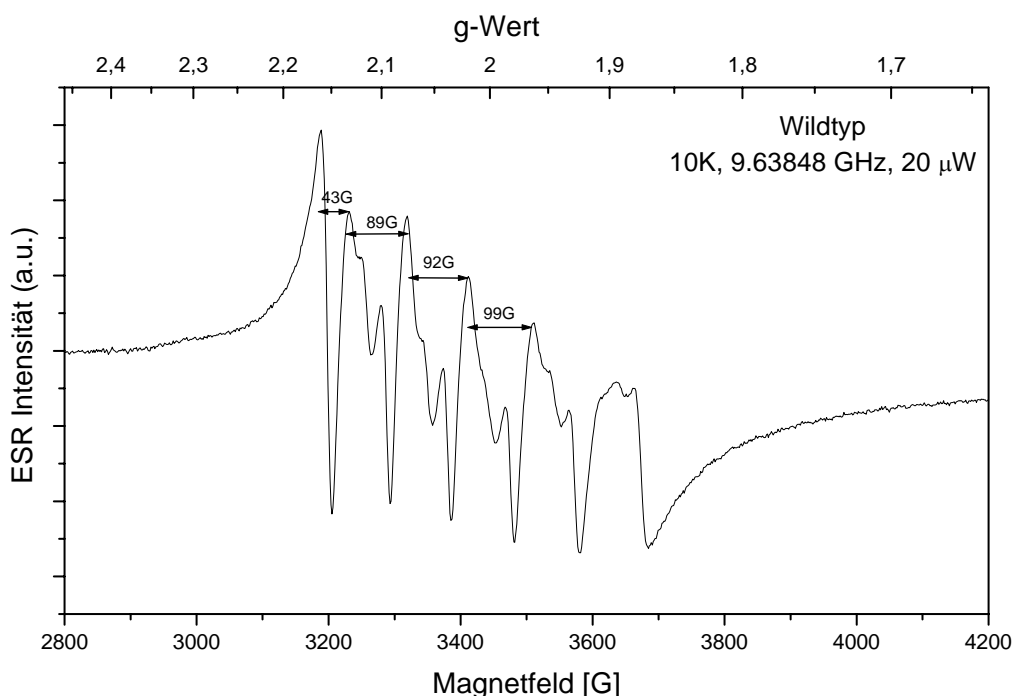


Abbildung 16: Das ESR-Spektrum von *Escherichia coli* HemF. Das Spektrum zeigt ein typisches Mn(II) Monomer. Es ist zentriert bei einem g-Wert von 2,0 und besitzt eine sechsfache Hyperfeinaufspaltung.

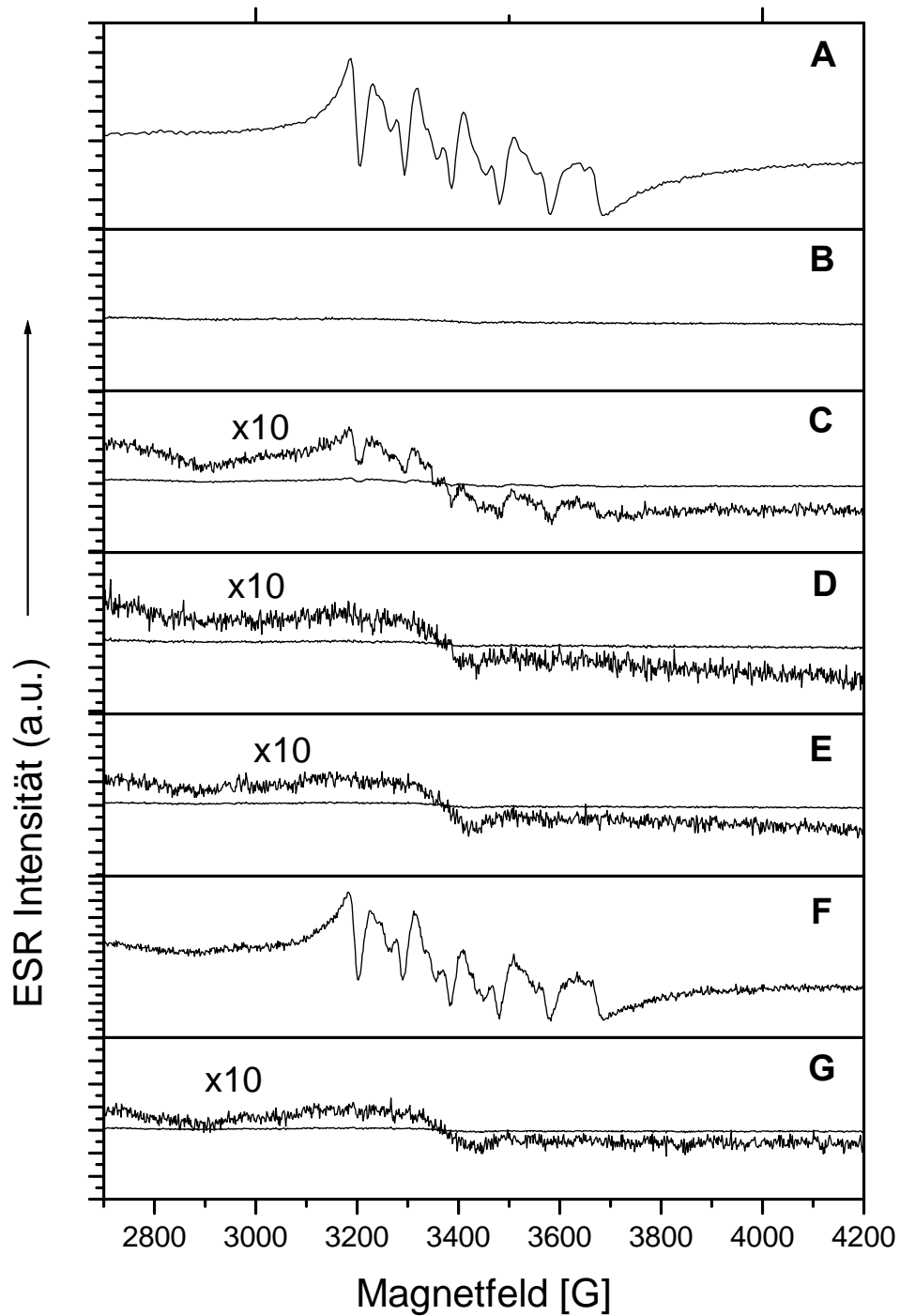


Abbildung 17: Vergleich der ESR – Spektren von verschiedenen HemF Varianten. Es wurden ESR – Spektren von HemF (A), vom Puffer (B) als Negativkontrolle, von HemF, das mit EGTA behandelt (D) und anschließend mit MnCl_2 rekonstituiert (C) wurde und von den Varianten HemF-H106L (E), HemF-H145L (F) und HemF-H175L (G) aufgenommen.

4.1.5 Nachweis der Porphyrinbindung an HemF und daran beteiligte Histidine

Das Absorptionsspektrum von gereinigtem *E. coli* HemF zeigte ein typisches Porphyrinspektrum mit einer Soret Bande bei 410 nm und 4 kleineren Peaks bei 503, 540, 570 und 630 nm (Abb 18 A), wie es auch durch Macieira und Mitarbeitern beschrieben und als das oxidierte Produkt Protoporphyrin IX identifiziert wurde (Macieira *et al.* 2003). Die Absorptionsspektren von HemF-H96L, HemF-H106L und HemF-H145L sind identisch zu dem Spektrum des Wildtypenzym (Abb 18 C, D, E), während das Spektrum von HemF-H175L keine porphyrinspezifische Absorption aufwies (Abb 18 B).

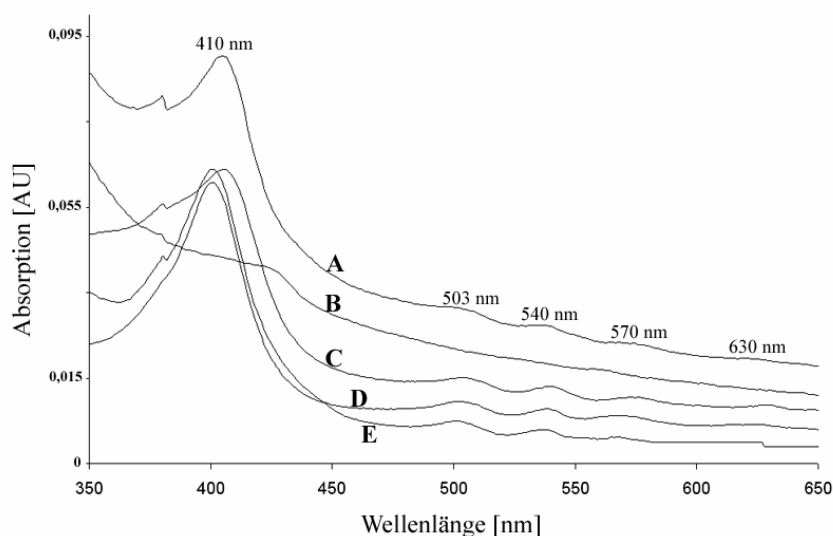


Abbildung 18: Spektroskopische Charakterisierung von rekombinantem *E. coli* HemF und verschiedenen HemF Varianten. UV/VIS-Spektrum von rekombinant gereinigten HemF Proteinen. Es wurden Spektren vom Wildtypenzym (A) und von den mutierten Enzymen HemF-H175L (B), HemF-H106L (C), HemF-H96L (D) und H145L (E) aufgenommen. Der Variante H175L fehlte das typische Absorptionsspektrum für Porphyrine.

4.1.6 Die Bedeutung der Histidinreste für die Mangan- und/oder Porphyrinbindung an HemF

Im Gegensatz zu früheren biochemischen Untersuchungen, die eine Bindung von Kupfer an das Mausenzym (Kohno *et al.*, 1996) und von Eisen an das Hefeenzym postulierten (Camadro *et al.*, 1986), zeigte die Kristallstruktur von Hefe CPO keinerlei

gebundenes Metall (Phillips *et al.*, 2004). Diese kontroversen Ergebnisse ließen bis dato keine eindeutigen Aussagen über die Metallbeteiligung an der Katalyse zu.

Mit Hilfe von ESR - Spektroskopie und Atomabsorption konnte erstmals die Bindung von Mangan an die *E. coli* CPO gezeigt werden. Da das Mn^{2+} -Ion relativ labil ist und thermodynamisch instabile Komplexe bildet, hat dies Auswirkungen auf die Isolation und Charakterisierung von Mangan enthaltenden Enzymen (Crowley *et al.*, 2000). Der komplette Verlust des Mangans kann möglich sein und könnte eine Erklärung für die Abwesenheit von Metallionen, z.B. in der HemF Kristallstruktur, sein. Andererseits sind speziesspezifische Unterschiede bei der Metallbindung durch sauerstoffabhängige CPOs nicht auszuschließen.

Das Fehlen eines Signals im ESR - Spektrum und in der Atomabsorption sowie die fehlende katalytische Aktivität des HemF-H106L sprechen für eine Beteiligung des Aminosäurerestes His106 an der Manganbindung. Bestätigt wurde die katalytische Relevanz dieser Aminosäure auch durch die zur Inaktivierung von HemF führenden Mutagenese des gleichen Histidinrestes im Enzym der Maus (Kohno *et al.* 1996). Ebenso konnte durch den Vergleich mit der Kristallstruktur von Hefe HemF (Phillips *et al.*, 2004) bestätigt werden, dass sich das His106 aus *E. coli* HemF, welches dem His131 aus der Hefe CPO entspricht, in dem postulierten aktiven Zentrum befindet. Die Variante HemF-H175L zeigte ebenfalls kein Signal im ESR-Spektrum, was einer Funktion bei der Manganbindung genauso zuzuordnen sein könnte. Das fehlende Porphyrinspektrum könnte aber auch ein Hinweis auf eine Rolle bei der Substrat- oder Produktbindung sein. Beim Vergleich mit der Kristallstruktur von Hefe zeigte sich, dass das His175 aus *E. coli* HemF dem His201 aus der Hefe CPO entspricht, welches in einer hoch konservierten Region liegt, die an der Dimerbildung beteiligt ist (Phillips *et al.*, 2004). Die Mutagenese des His175 könnte zu einem Fehler bei der Dimerbildung geführt haben, was eine Destabilisierung des aktiven Zentrums mit dem Verlust der Fähigkeit zur Mangan- und/oder Porphyrinbindung zur Folge haben könnte. Die katalytisch relevanten Histidinreste H96 und H145 schienen keinen Einfluss sowie auf die Manganbindung als auch auf die Produktbindung zu haben, welches der Vergleich mit der Kristallstruktur bestätigte. Die beiden Histidine H96 und H145 entsprechen den Aminosäuren H121 und H171 der Hefe CPO und befinden sich ebenfalls in einem hochkonservierten Bereich von HemF, aber weder in dem von Phillips und Mitarbeitern postulierten aktiven Zentrum noch in der für die Dimerbildung wichtigen Region (Phillips *et al.*, 2004).

In vielen Manganenzymen erfolgt die Koordinierung des Metalls über mehrere Histidin Reste. Weitere Liganden sind oft Aspartat- oder Glutamatreste. Zwei Enzyme mit einem mononucleären Manganzentrum sind die Oxalat Oxidase und die Mangan-Superoxid-Dismutase. In beiden Proteinen ist das Manganion über drei Histidinreste und ein Glutamat- bzw. Aspartatrest koordiniert (Woo *et al.*, 2000, Whittaker 2000). Die hier dargestellten Ergebnisse sowie die Tatsache, dass die Äquivalente der vier untersuchten Aminosäurereste in der Hefe-Kristallstruktur zu weit voneinander entfernt sind, schließen eine gemeinsame Beteiligung der vier Histidin Reste an der Mangankoordination in *E. coli* HemF aus.

4.1.7 Möglicher Enzymmechanismus für die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase

In der Natur dient Mangan oft der Koordinierung und Aktivierung von Sauerstoff. Ein Beispiel für so ein Mangan enthaltendes Enzym ist die Oxalat Oxidase, welche Oxalsäure, unter Verwendung von Sauerstoff, zu CO₂ und H₂O₂ umsetzt (Lane, 1994; Svedruzic *et al.*, 2005). Biochemische und spektroskopische Studien zeigten, dass die Oxalat Oxidase aus Gerste ein mononucleäres Mangancenter für die Katalyse verwendet (Requena *et al.*, 1999, Woo *et al.*, 2000). Ein vorhergesagter Mechanismus für dieses Enzym schließt die Beteiligung einer Mn(III) – superoxo - Form an der Katalyse mit ein (Tanner *et al.*, 2001). Mit dem Hintergrund des radikalischen Enzymmechanismus der sauerstoffunabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase HemN, könnte eine mögliche Rolle des an HemF gebundenen Mangans in der Bindung von Sauerstoff und der Bildung solch einer Mn(III) – superoxo - Form liegen. Das gebildete Radikal führt dann zu einer Abspaltung des Wasserstoffs am β -C Atom der Propionatseitenkette des Substrats und zur Bildung eines Substratradikals. Anschließend folgt die Bildung der Vinylgruppe mit Elimination von CO₂. Dabei könnte der Sauerstoff als Elektronenakzeptor dienen und zur Bildung von Wasserstoffperoxid führen (Abb. 19).

Alternativ, wäre eine strukturelle aber essentielle Funktion des Mangans ohne jegliche Beteiligung am Enzymmechanismus denkbar. Das würde dann aber einen Cofaktor - freien Katalysemechanismus bedeuten. Bis heute sind nur sehr wenig Enzyme bekannt, die so eine Katalyse durchführen. Dazu gehören die bereits erwähnte Urat Oxidase (Kahn *et al.* 1997, Colloc'h *et al.*, 1997) sowie die Quinon - bildenden

Monooxygenasen und die 2,4-Dioxygenasen. Bei den postulierten Mechanismen der Oxygenasen muss die Sauerstoff- und/oder Substrataktivierung durch Aminosäurereste erfolgen. Zwei Möglichkeiten werden dabei diskutiert: entweder die Bildung eines Proteinradikal Intermediats oder ein direkter Elektronentransfer vom deprotonierten Substrat auf den molekularen Sauerstoff (Fetzner, 2002). Bis jetzt gibt es allerdings noch keinen Nachweis eines Enzymradikals weder bei der sauerstoffunabhängigen CPO HemN noch bei dem sauerstoffabhängigen Enzym HemF. Auch die Ergebnisse hinsichtlich des Sauerstoffverbrauchs während der HemF Katalyse sprechen gegen die Bildung eines Proteinradikals. Fast alle diese Oxygenasen besitzen ein Histidin, das für die Katalyse essentiell ist. Es wird angenommen, dass es als Base bei einer Protonabstraktion fungieren könnte (Fetzner, 2002). Eine ähnliche Funktion wäre dann auch für das hier untersuchte His106 aus *E. coli* denkbar. In Anlehnung an die Urat Oxidase wurde in einer kürzlich erschienen Publikation ein Basen - katalysierter, Cofaktor - freier Reaktionsmechanismus für die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase postuliert (Lash 2005).

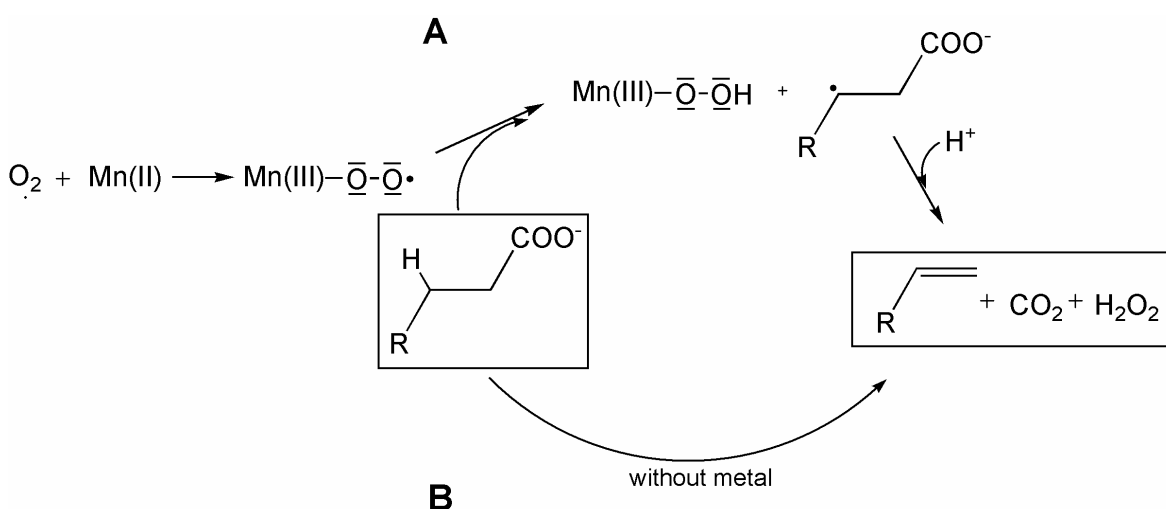


Abbildung 19: Zwei mögliche Katalysewege für die von HemF katalysierte Reaktion. A, potentieller Katalysemechanismus mit Beteiligung von Mangan. B, Metallfreie Katalyse.

4.2 Rekombinante Produktion und Reinigung des HemF aus *Thermosynechococcus elongatus*

Oft kann die Aufklärung der Kristallstruktur eines Enzyms auch zu einer Klärung des durch dieses Enzym katalysierten Mechanismus beitragen. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit ein Expressionssystem etabliert werden, dass eine rekombinante Produktion von HemF aus dem thermophilen Organismus *Thermosynechococcus elongatus* ermöglicht, welches zur späteren Kristallisation verwendet werden kann.

Das *T. elongatus hemF*-Gen wurde in den Expressionsvektor pET22b(+) kloniert. Es wurden fünf Plasmide nach der ersten DNA- Minipräparation ausgewählt, die ein *hemF*-Insert enthielten, und jeweils in die *E. coli* Expressionswirte BL21(λ DE3), BL21(λ DE3)pLysS und BL21CodonPlus™(DE3)-RIL transformiert und Expressionsversuche durchgeführt. Eine deutliche Überproduktion des HemF Fusionsproteins konnte nur in dem *E. coli* Stamm BL21(λ DE3)pLysS beobachtet werden. Um in diesem System einen optimalen Gehalt an löslichem Protein zu erzielen wurden die Temperatur, die zeitliche Länge und die Konzentration des Induktionsmittels (IPTG) variiert. Als optimal erwiesen sich folgende Bedingungen: Wachstum des Wirts vor und nach der Induktion bei 37 °C, Induktion bei einer $OD_{578} = 0,5 - 0,7$, Induktion mit 0,5 mM IPTG, Dauer der Induktion 5 h. Das hierbei produzierte Fusionsprotein enthält einen C-terminalen His₆-Tag der die Affinitätschromatographische Reinigung über eine HiTrap Chelating Säule ermöglichte. Das so gereinigte Enzym wurde im Standardenzymtestsystem (siehe 3.6.5) auf Coprogen Oxidase Aktivität überprüft, wobei parallel ein Aktivitätstest mit *E. coli* HemF als Positivkontrolle durchgeführt wurde. Hier besaßen beide Enzyme ungefähr die gleiche Aktivität (Abb. 20). Nach der ersten affinitätschromatographischen Reinigung konnte neben dem *T. elongatus* HemF (ca. 40 kDa) ein zweites Protein von ca. 70 kDa Größe auf der SDS-PAGE identifiziert werden, das in ungefähr der gleichen Konzentration mitgereinigt wurde (Abb. 20). Mit Hilfe von präparativer Gelpermeationschromatographie war eine teilweise Abtrennung beider Proteine möglich. Allerdings ging diese Abtrennung mit einer starken Degradierung des *T. elongatus* HemF einher (Abb. 21). Es wurde eine N-terminale Sequenzierung beider Proteine mittels Edman-Abbau durchgeführt. Für die 40 kDa Bande ergab sich die Sequenz MDTKRPFIRIPL, welche mit der Aminosäuresequenz von *T. elongatus* HemF identisch ist. Für die 70 kDa Bande ergab sich die Sequenz GKIIIGIDLGT. Diese Sequenz ist identisch mit der N-terminalen Aminosäuresequenz des Chaperons DnaK aus *E. coli*. Die

lösliche Expression von *T. elongatus* HemF in *E. coli* hängt in diesem Fall offensichtlich von der Coexpression eines Chaperons ab, was eine nicht korrekte Faltung von HemF vermuten lässt. Bestätigt wird dies ebenfalls durch den Proteinabbau nach der Abtrennung des Chaperons. Da mit diesem System offensichtlich kein stabiles HemF exprimiert werden konnte, wurde von einer weiteren Verwendung des Enzyms für Kristallisationsexperimente abgesehen. Um stabiles lösliches *T. elongatus* HemF produzieren zu können, wäre es nötig alternative Expressionssysteme auf stabile Proteinproduktion zu testen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Eine Stabilisierung des Proteins könnte durch eine Coexpression mit anderen Enzymen der Tetrapyrrol Biosynthese, wie z.B. der Protoporphyrinogen IX Oxidase, ermöglicht werden. Es ist durchaus in Betracht zu ziehen, dass die Enzyme dieses Biosynthesewegs in einem Komplex zusammenarbeiten (Koch *et al.*, 2004; Ferreira *et al.* 1988) und sich deswegen auch gegenseitig stabilisieren könnten, was Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein sollte.

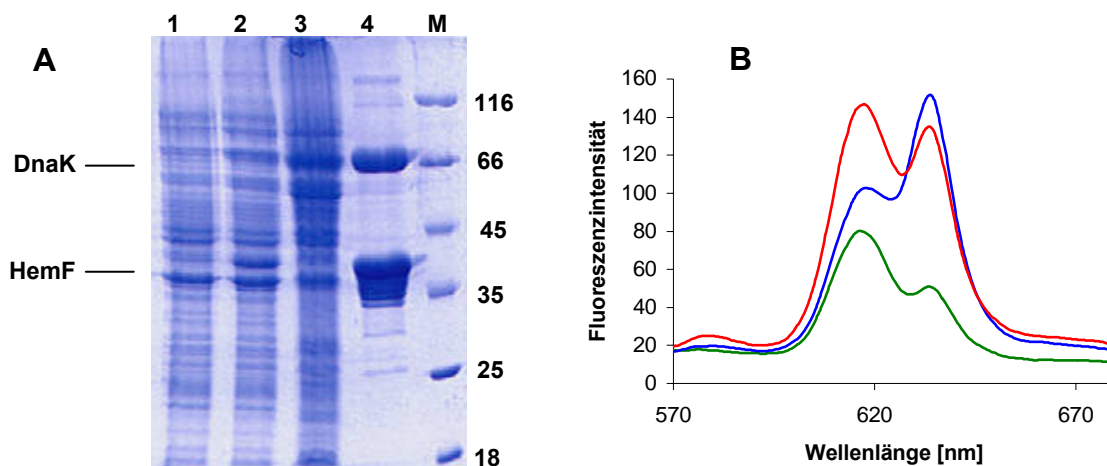


Abbildung 20: Reinigung und funktionelle Charakterisierung von rekombinantem *T. elongatus* HemF. A, Das 10 %ige Coomassie Brilliant Blau gefärbte SDS-Gel zeigt die Proteine von *E. coli* Zellen mit dem Plasmid pET-22bhemFTE vor IPTG-Induktion (Bahn 1), nach IPTG-Induktion der Genexpression (Bahn 2), die löslichen Proteine nach dem Zellaufschluss (Bahn 3) und das gereinigte HemF-His₆ Fusionsprotein (Bahn 4). Bahn M zeigt die Proteine des Dalton Mark VII. Die relative Masse ($\times 10^3$) ist angegeben. B, Fluorimetrische Detektion des oxidierten Produkts Protoporphyrin IX bei 633 nm sowie des oxidierten Edukts bei 618 nm. Es wurde der Standardenzymtest (3.6.5) mit HemF aus *T. elongatus* (rot), aus *E. coli* (blau) und ohne Enzym als Negativkontrolle (grün) durchgeführt.

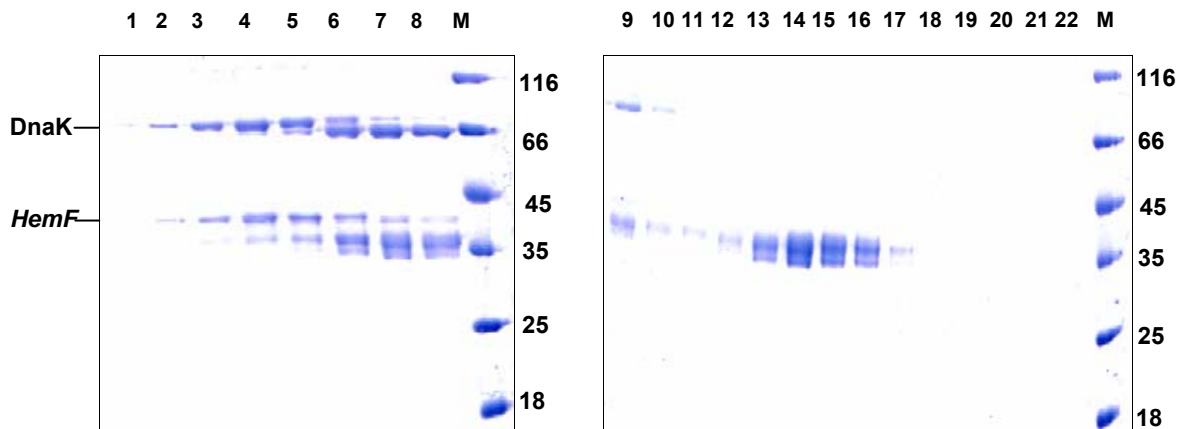


Abbildung 21: Gelpermeationschromatographische Reinigung von *T. elongatus* HemF. Das 10 %ige Coomassie Brilliant Blau gefärbte SDS-Gel zeigt die Fraktionen einer Gelfiltration von affinitätschromatographisch gereinigtem HemF-His₆ auf Superdex 200 (Bahnen 1 – 22). HemF konnte teilweise von DnaK abgetrennt werden (Bahnen 11 – 17), unterlag dann aber starker Degradation. Bahn M zeigt die Proteine des Proteinmarkers (Fermentas). Die relative Masse ($\times 10^3$) ist angegeben.

4.3 Die sauerstoffunabhängige Oxidation von Protoporphyrinogen IX

Tiere, Hefen, Pflanzen und einige, meist Gram-positive, Bakterien besitzen eine sauerstoffabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase, kodiert durch das Gen *hemY*. Dieses gut charakterisierte Flavin-Enzym katalysiert die Oxidation von Protoporphyrinogen IX (Proto) zu Protoporphyrin IX (Proto). Dabei werden 6 Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen.

Viele Mikroorganismen besitzen entweder *hemY*, *hemG* oder keines der beiden bekannten Gene für die Protoporphyrinogen IX Oxidase (Panek *et al.*, 2002). Da Protoporphyrinogen IX Oxidase Mutanten von *E. coli* (Sasarman *et al.*, 1979) und *B. subtilis* (Homouth *et al.*, 1999) einen Häm-Mangel aufweisen, ist eine Autooxidation, wie sie *in vitro* stattfinden kann, ausgeschlossen. Es wird also ein alternatives Enzymsystem benötigt. Ältere physiologische und biochemische Untersuchungen deuten auf ein membranständiges oder membranassoziiertes Enzymsystem hin (Jacobs *et al.*, 1977a, b). Dieses unbekannte System sollte nachgewiesen und charakterisiert werden.

4.3.1 Nachweis von Protoporphyrinogen IX Oxidase Aktivität in Zellextrakt von *Escherichia coli*

4.3.1.1 Aktivitätsmessung mittels Fluoreszenzspektroskopie

Als Modellsystem für eine Charakterisierung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO) wurde *E. coli* gewählt. Bereits aus früheren Untersuchungen an zellfreiem Extrakt aus *E. coli* ist bekannt, dass die sauerstoffunabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase Fumarat als Elektronenakzeptor verwendet (Jacobs *et al.*, 1975). In Zellextrakt von *E. coli* Zellen, die mit Nitrat gewachsen sind, konnte die Protoporphyrinogen IX Oxidation ebenfalls mit Nitrat als physiologischem Elektronenakzeptor gezeigt werden (Jacobs *et al.*, 1976). Der Nachweis der Fumarat abhängigen Protogen Oxidase Aktivität konnte unter Verwendung von *E. coli* Zellextrakt auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Dafür wurden *E. coli* Zellen des Stamms BL21(ΔDE3) in TB Medium mit Fumarat als Zusatz kultiviert. Nach ca. 8 h anaerobes Wachstum erreichten die Zellen eine OD von ca. 2, wurden dann in einer sauerstofffreien Atmosphäre zentrifugiert und zur Gewinnung des Zellextrakts verwendet. Mit diesem Zellextrakt wurde dann der Standardenzymtest (siehe 3.6.9) unter Verwendung von 10 mM Fumarat als Elektronenakzeptor durchgeführt. Nach dem Mischen der Reaktionslösung unter anaeroben Bedingungen in einer Fluoreszenzküvette konnte sofort ein Fluoreszenzspektrum im Bereich von 570 nm bis 680 nm aufgenommen werden. Die Bildung von Protoporphyrin IX ließ sich nun über die Zeit, anhand der steigenden Fluoreszenzintensität bei 633 nm, verfolgen (Abb. 22). Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde unter denselben Bedingungen in Abwesenheit des Zellextraktes in einer Referenzküvette verfolgt, um Einflüsse durch eine mögliche Autooxidation auszuschließen. Um zu überprüfen ob Nitrat in diesem System ebenfalls als Elektronenakzeptor agiert wurde ein Zellextrakt von *E. coli* Zellen, die mit Nitrat gewachsen sind, hergestellt. Im Aktivitätstest mit diesem Zellextrakt und 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor erfolgte nur eine sehr geringe Oxidation von Protogen, die mit Aktivitäten des Extrakts ohne Zugabe von Elektronenakzeptor vergleichbar war. Addierte man zum Nitrat-Extrakt Fumarat so erfolgt eine ähnlich starke Protogen Umsetzung wie mit dem Fumarat-Extrakt. Umgekehrt funktionierte Nitrat auch mit dem Extrakt aus Fumarat- gewachsenen *E. coli* nicht als Elektronenakzeptor.

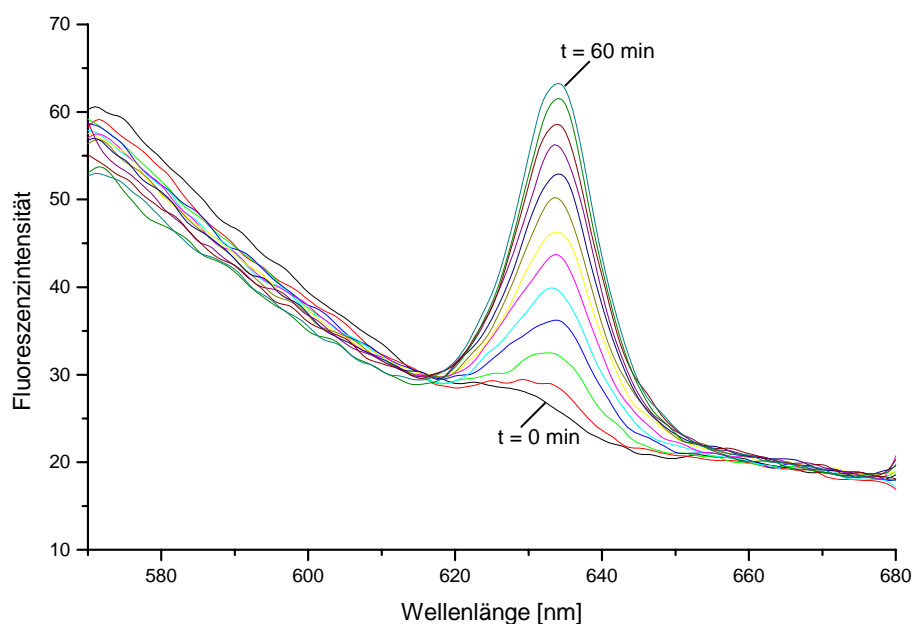


Abbildung 22: Fumarat abhängige Bildung von Protoporphyrin IX in Zellextrakt aus *E. coli*. 10 mg Zellextrakt aus *E. coli* wurden mit 10 mM Fumarat und 10 μ M Protogen versetzt (siehe 3.6.9). Die Bildung von Protoporphyrin IX kann anhand der steigenden Fluoreszenzintensität bei 633 nm verfolgt werden.

4.3.1.2 Triphenyl-tetrazoliumchlorid kann als alternativer Elektronenakzeptor für die Oxidation von Protoporphyrinogen IX verwendet werden

Die Oxidation von Protoporphyrinogen IX ist an die Elektronentransportkette gekoppelt (Jacobs *et al.*, 1976), was auch die Beteiligung von Fumarat als Elektronenakzeptor zeigt und eine Rolle für die Fumarat Reduktase nicht ausschließt. Die chromatographische Reinigung der Protoporphyrinogen IX Oxidase, was ein Ziel dieser Arbeit war, wird dadurch aber erschwert. Der Verlust der Fumarat Reduktase oder anderer Komponenten des Elektronentransportsystems während der Reinigungsprozedur würde zum Erliegen des Enzymtestsystems führen. Aus diesem Grund war es notwendig ein alternatives Elektronenakzeptorsystem zu finden. Aus einer Reihe von vielen verschiedenen, getesteten Verbindungen (Tab. 5) waren die meisten nicht in der Lage Elektronen von der Protogen Oxidase aufzunehmen. Einige dieser artifiziellen Akzeptoren konnten in den eingesetzten Konzentrationen das Substrat auch ohne Zusatz von Zellextrakt oxidieren und waren deshalb für eine Verwendung im Enzymtestsystem nicht geeignet. So besitzt zum Beispiel auch der Elektronenakzeptor DCIP, welcher bei der

Reinigung der Protoporphyrinogen Oxidase aus *Desulfovibrio gigas* eingesetzt wurde (Klemm *et al.*, 1987), die Fähigkeit Elektronen direkt von Protogen aufzunehmen. Damit stellt sich an dieser Stelle dann auch die Frage ob es sich bei dem von Klemm gereinigten Proteinkomplex wirklich um die Protoporphyrinogen Oxidase handelt. Von allen getesteten Verbindungen war das Tetrazoliumsalz TTC (2, 3, 5- Triphenyl-tetrazoliumchlorid, Abb. 23) in einer Konzentration von 2,5 μM neben Fumarat der einzige funktionierende Elektronenakzeptor. TTC ist dafür bekannt mit der Atmungskette zu interagieren. Untersuchungen an eukaryotischen Mitochondrien sowie an Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii* und *E. coli* zeigten, dass die Elektronen direkt von den Cofaktoren der Dehydrogenasen auf TTC übertragen werden (Rich *et al.*, 2001). Dehydrogenasen katalysieren Oxidationsreaktionen, bei der Wasserstoffatome auf Cofaktoren übertragen werden. Da es sich dabei um einen Reaktionsmechanismus handelt, der für die Bildung von Protoporphyrin IX ebenfalls möglich ist, kann man davon ausgehen, dass die Elektronen von der Protogen Oxidase direkt auf TTC übertragen werden. So existiert nun ein von der Atmungskette unabhängiges Aktivitätstestsystem, mit dem eine anschließende Reinigung der Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *E. coli* erleichtert wird.

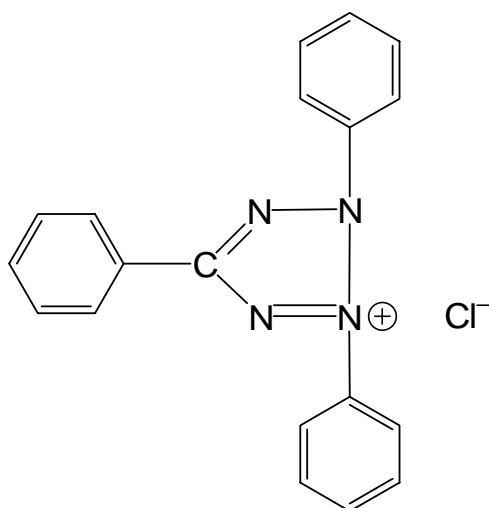


Abbildung 23: Strukturformel von 2, 3, 5- Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC).

Tabelle 5: Einfluss verschiedener Elektronenakzeptoren auf die Bildung von Protoporphyrin IX durch *E. coli* Zellextrakt.

Elektronenakzeptor ^A	Konzentration	Autooxidation	gebildetes Proto ^{A,B} [pmol] nach 30 min	gebildetes Proto ^{A,B} [pmol] nach 60 min
---	---	---	3,8	7,7
Fumarat	10 mM	---	20,5	45,6
KNO ₃	10 mM	---	2,9	4,3
NAD	1 mM	---	5,2	8,2
	50 µM	---	3,7	5,7
NADP	1 mM	---	3,9	7,2
DCIP	2,5 µM	+	---	---
Methylviologen	2,5 µM	---	3,5	4,8
Benzylviologen	2,5 µM	---	3,5	4,8
Phenanzinmethosulfat	2,5 µM	+	---	---
Methylenblau	2,5 µM	+	---	---
TEMED	10 µM	---	3,4	5,9
	2,5 µM	---	3,8	3,2
Menadion	2,5 µM	+	---	---
Vitamin K1	2,5 µM	+	---	---
2, 3, 5- Triphenyl- tetrazoliumchlorid (TTC)	10 µM	---	5,2	9,3
	5 µM	---	5,6	9,1
	2,5 µM	---	8,4	17,9

^ADer Standardenzymtest (siehe 3.6.9) wurde mit 10 mg bakteriellem Protein und dem jeweiligen Elektronenakzeptor durchgeführt.

^BÜber die Fluoreszenzintensität bei 633 nm wurde die Menge an Proto bestimmt, die nach 30 bzw. 60 min durch je 10 mg Protein des Zellextraktes gebildet wird.

4.3.2 Die sauerstoffunabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *E. coli* ist ein Membran assoziiertes Protein

Da es sich bei der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase vermutlich um ein Membran ständiges oder zumindest Membran assoziiertes Enzym handelt (Klemm *et al.*, 1987), wurden mittels eines diskontinuierlichen Sucrose Gradienten die löslichen Proteine und die Membranfraktion voneinander getrennt. Aktivitätsmessungen in beiden Fraktionen bestätigten, dass es sich bei dem gesuchten Enzym um ein Membran assoziiertes Protein handelte. Während durch die Membranfraktion Protogen oxidiert werden konnte besaßen die Proteine der löslichen Fraktion nur eine sehr geringe Aktivität (Abb. 24). Die Geschwindigkeit der Protoporphyrinogen Umsetzung durch die Membranfraktion war im Vergleich zum Zellextrakt deutlich erhöht (Abb. 24). Die gebildete Menge an Protoporphyrin IX durch die Membranfraktion nach 20 min Inkubation mit Fumarat als Elektronenakzeptor im Standardenzymtestsystem betrug 97,2 pmol/ mg Protein. Gegenüber der Aktivität des Zellextrakts von 1,6 pmol/ mg Protein stellte dies eine 60fache Erhöhung dar (Tab. 6), was zum Einen durch den hier erfolgten Reinigungsschritt bedingt war. Zum Anderen stellte die Membranfraktion wahrscheinlich ein optimales System für die Oxidation von Protogen dar. Dieses System enthielt alle Komponenten, die aufgrund der Kopplung von Protoporphyrinogen IX Oxidase mit der ebenfalls in der Membran lokalisierten Atmungskette benötigt werden (Jacobs *et al.*, 1977, 1978.). So war z.B. Menaquinon, das die Elektronen von der Protogen Oxidase auf die Fumarat Reduktase übertragen könnte, vorhanden.

Tabelle 6: Bildung von Protoporphyrin IX durch verschiedene Proteinfractionen von *E. coli*.

Elektronenakzeptor	Gebildetes Proto [pmol/mg Protein] nach 20 min ^A		
	10 mM	2,5 µM TTC	- - -
	Fumarat		
Zellextrakt	1,6	0,7	0,33
Membranfraktion	97,2	10,7	6,5
lösliche Proteine	1,1	0,8	0,3

^ADer Standardenzymtest (3.6.9) mit dem jeweiligen Elektronenakzeptor wurde durchgeführt und die nach 20 min produzierte Menge an Proto über die Fluoreszenzintensität bei 633 nm bestimmt.

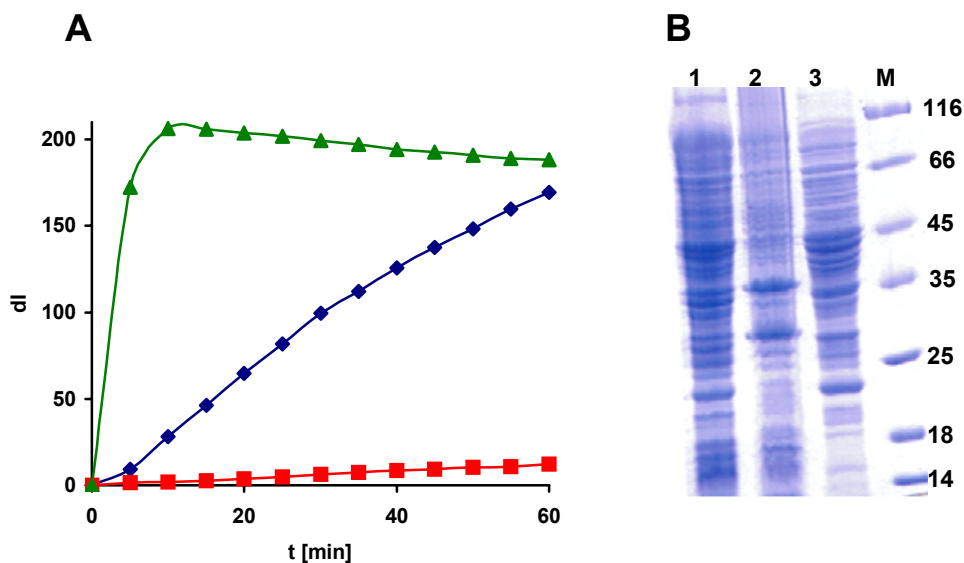


Abbildung 24: Sauerstoffunabhängige PPO Aktivität in der Membranfraktion von *E. coli*. A, Bildung von Protoporphyrin IX durch verschiedene Proteinfractionen im Standardenzymtestsystem mit Fumarat als Elektronenakzeptor (siehe 3.6.9) und mit je 3 mg Zellextrakt (blau), Membranfraktion (grün) und lösliche Proteine (rot). B, Das 10 %ige Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Gel zeigt die Proteine des Zellextrakts (Bahn 1), der Membranfraktion (Bahn 2) und der Fraktion mit löslichen Proteinen (Bahn 3). Bahn M zeigt die Proteine des Proteinmarkers (Fermentas). Die relative Masse ($\times 10^3$) ist angegeben.

4.3.3 Die Kopplung der Oxidation von Protoporphyrinogen IX mit der Atmungskette

4.3.3.1 Elektronen werden von der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase auf die Fumarat Reduktase übertragen

Die Fumarat Reduktase ist als Bestandteil der Atmungskette in der Zellmembran lokalisiert und katalysiert unter anaeroben Bedingungen die Reduktion von Fumarat. Die dafür erforderlichen Elektronen bezieht das Enzym aus dem Menaquinon Pool (Van Hellemond *et al.*, 1994; Cecchini *et al.*, 2002, 2003). Die bei der Bildung von Protoporphyrin IX freiwerdenden Elektronen dienen dieser Reduktion von Fumarat, was durch Aktivitätstests mit Membranfraktionen verschiedener *E. coli* Stämme gezeigt werden konnte. Dabei wurden der Fumarat Reduktase defiziente Stamm DW35 mit den Stämmen BL21(λ DE3) und DW35/pH3, bei dem das Plasmid pH3 für alle 4 Untereinheiten der Fumarat Reduktase kodiert, verglichen (Abb. 25). Der Standardenzymtest wurde unter Verwendung der jeweiligen Membranfraktionen, isoliert wie unter 3.6.7 beschrieben,

durchgeführt. Nach einer Stunde Inkubation mit Fumarat als Elektronenakzeptor wurde die Menge an gebildetem Proto bestimmt. Die Membranfraktionen der Stämme BL21(λ DE3) und DW35/pH3 konnten ungefähr die gleiche Menge Protogen oxidieren. Im Gegensatz dazu ist die Menge an gebildetem Proto durch DW35 aufgrund der fehlenden Fumarat Reduktase sehr gering. Das Vorhandensein der Fumarat Reduktase sollte bei Verwendung von TTC als Elektronenakzeptor ohne Bedeutung sein. Tatsächlich konnten durch die Membranfraktionen der Stämme DW35 und BL21(λ DE3) mit TTC ähnliche Mengen an Proto gebildet werden. Allerdings wurde mit Membranfraktionen von DW35/pH3 eine gesteigerte Bildung von Proto erzielt.

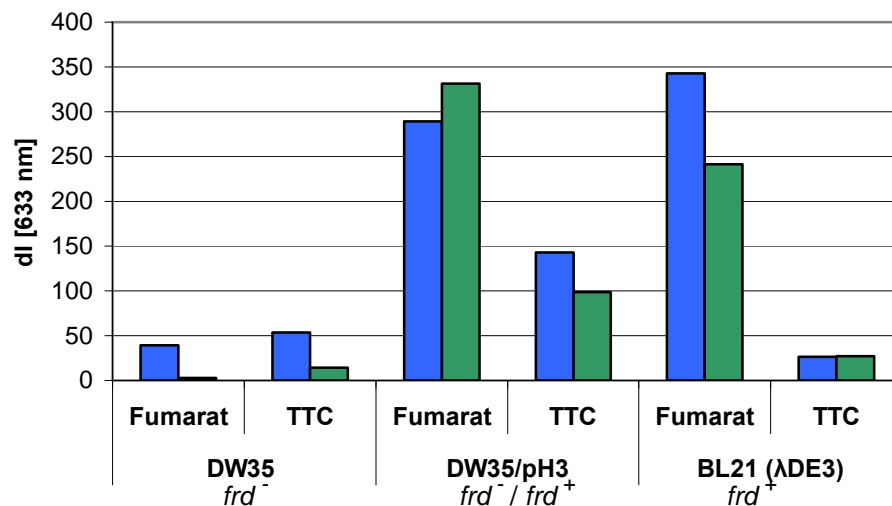


Abbildung 25: Beteiligung der Fumarat Reduktase an der sauerstoffunabhängigen PPO Aktivität in *E. coli*. Gezeigt ist die Bildung von Protoporphyrin IX durch Membranfraktionen von *E. coli* DW35 (Fumarat Reduktase defizient), DW35/pH3 (komplementiert mit Fumarat Reduktase Genen) und BL21(λ DE3) (Wildtyp). Durchgeführt wurde ein Standardenzymtest (siehe 3.6.9) mit je zwei verschiedenen, unabhängig präparierten Membranfraktionen (grün und blau) entweder mit 10 mM Fumarat oder 2,5 μ M TTC als Elektronenakzeptor. Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität bei 633 nm nach eine Stunde Inkubationszeit.

4.3.3.2 HemG ist an der Oxidation von Protoporphyrinogen IX beteiligt

Mutagenesestudien konnten das Gen *hemG* aus *E. coli* bereits als wichtig für die Oxidation von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX identifizieren (Sasarman *et al.*, 1979). Von dem *hemG* defizienten *E. coli* Stamm SASX38 wurde, ebenfalls wie unter 3.6.7 beschrieben, die Membranfraktion isoliert. Aktivitätstests mit dieser Membranfraktion im Vergleich zur Membranfraktion des *E. coli* Stamms BL21(λ DE3) zeigten mit Fumarat als Elektronenakzeptor eine deutlich verringerte Protogen Oxidase-

Aktivität (Abb. 26). Bei der Verwendung von TTC als Elektronenakzeptor im Enzymtest konnte kein deutlicher Unterschied zwischen beiden Membranfraktionen beobachtet werden. Das durch *hemG* kodierte Protein ist also offensichtlich an der Elektronenübertragung bei der Oxidation von Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX und der daran anschließenden Reduktion von Fumarat beteiligt.

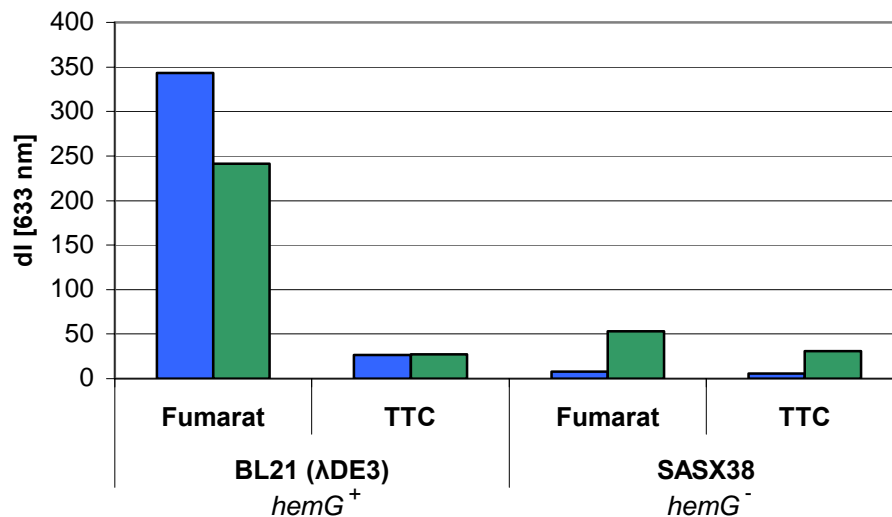


Abbildung 26: Beteiligung von HemG an der sauerstoffunabhängigen PPO Aktivität in *E. coli*. Gezeigt ist die Bildung von Protoporphyrin IX durch Membranfraktionen von *E. coli* BL21(Δ DE3) (Wildtyp) und SASX38 (*hemG* defizient). Durchgeführt wurde ein Standardenzymtest (siehe 3.6.9) mit je zwei verschiedenen, unabhängig präparierten Membranfraktionen (grün und blau) entweder mit 10 mM Fumarat oder 2,5 μ M TTC als Elektronenakzeptor. Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenzintensität bei 633 nm nach eine Stunde Inkubationszeit.

4.3.3.3 Der Elektronenfluss bei der Oxidation von Protoporphyrinogen IX

Die Oxidation von Protoporphyrinogen IX unter anaeroben Bedingungen ist mit der Elektronentransportkette gekoppelt, wobei Fumarat als physiologischer Elektronenakzeptor dient (Jacobs *et al.*, 1977a). Als Wasserstoffüberträger dient dabei der Menaquinon Pool (Jacobs *et al.*, 1977b, 1978). Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen lässt sich nun ein Elektronenfluss postulieren, bei dem die Elektronen ausgehend von der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase über den Menaquinon Pool auf die Fumarat Reduktase übertragen werden (Abb. 27 A). HemG konnte als für diesen Elektronenfluss wichtig identifiziert werden. Zum Einen besteht die Möglichkeit, dass es sich bei HemG um die Protoporphyrinogen IX Oxidase oder

zumindest um eine Untereinheit des Enzyms handelt. Da mit TTC als Elektronenakzeptor eine Verringerung der Protogen Oxidase Aktivität der *hemG* Mutante nicht beobachtet werden konnte, erscheint es wahrscheinlicher, dass es sich bei HemG um ein weiteres Enzym handelt, welches an Elektronenübertragungsprozessen beteiligt und womöglich mit der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrin IX Oxidase gekoppelt ist (Abb. 27 B). Die Homologie des HemG zu Flavodoxin könnte ebenfalls ein Hinweis auf eine Funktion bei der Elektronenübertragung sein. Das seltene Auftreten des *hemG* Gens spricht allerdings gegen eine Beteiligung an der Protogen Oxidation bei einem breiteren Spektrum von Bakterien. Gleichzeitig ist die Verbreitung der Fumarat Reduktase im Bakterienreich beschränkt. Entweder gibt es also innerhalb von verschiedenen bakteriellen Gruppen unterschiedliche Systeme für die sauerstoffunabhängige Oxidation von Protogen oder ein anderes Enzym, wie z. B. ein Flavodoxin oder ein anderes Flavonukleotid bindendes Enzym, könnte dort die Funktion von HemG übernehmen.

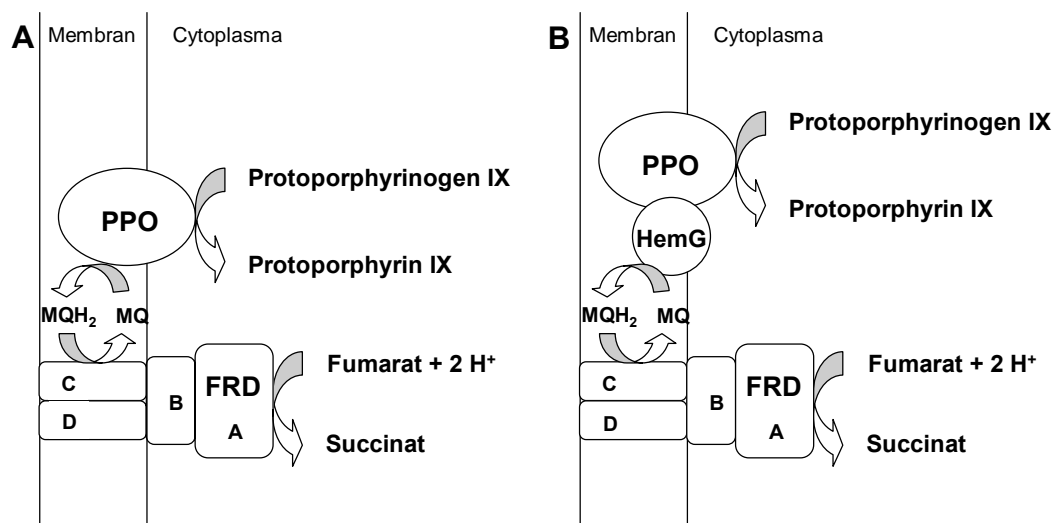


Abbildung 27: Mögliche Kopplung des Elektronenflusses bei der Oxidation von Protoporphyrinogen IX. A, Die Übertragung der Elektronen von der Protoporphyrinogen IX Oxidase über den Menaquinon Pool auf die Fumarat Reduktase. B, Der Elektronenfluss unter Beteiligung von HemG. PPO, Protoporphyrinogen IX Oxidase; FRD, Fumarat Reduktase; MQ, Menaquinon; MQH₂, reduziertes Menaquinon.

4.3.4 Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *E. coli*

4.3.4.1 Solubilisierung von Proteinen aus der Membranfraktion

Die Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase erfolgte ausgehend von der aus *E. coli* isolierten Membranfraktion. Da die Protogen Oxidase aus *Desulfovibrio gigas* mit Tween 80 (Klemm *et al.*, 1987) und die *E. coli* Fumarat Reduktase mit Thesit (Luna-Chavez *et al.*, 2000) aus den Membranen solubilisiert werden konnten, wurden diese beiden nichtionischen Detergenzien neben dem ebenfalls nichtionischen Triton X100 in Konzentrationen von jeweils 3 % und 0,3 % (v/v) auf ihr Fähigkeit die Proteine aus der Membran zu lösen getestet. Beim Vergleich der Protogen Oxidase Aktivitäten von solubilisierten mit nicht solubilisierten Proteinen zeigte sich das 0,3 % Triton X100 am besten für die Solubilisierung geeignet sind (Abb. 28). Die so solubilierte Proteinfraction bildete im Standardenzymtestsystem nach 20 min mit Fumarat als Elektronenakzeptor 340,5 pmol Proto/ mg Protein (Tab. 7 Seite 77). Für die nachfolgenden Reinigungsschritte erfolgte die Solubilisierung der Proteine deshalb immer mit 0,3 % Triton X100.

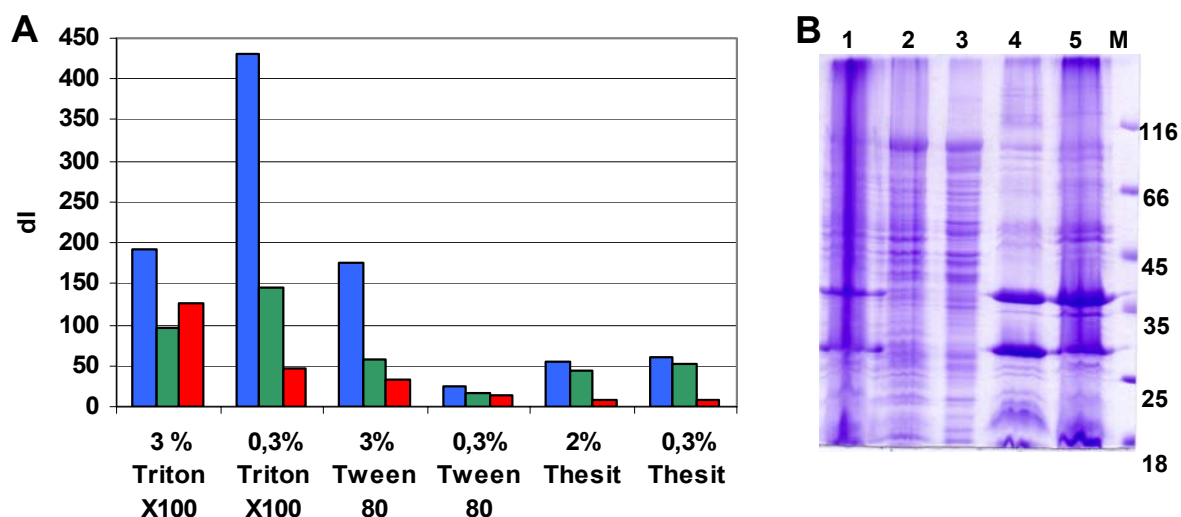


Abbildung 28: Einfluss der Solubilisierung der Proteine in der Membranfraktion auf die sauerstoffunabhängige PPO Aktivität. A, Bildung von Protoporphyrin IX nach 60 min. durch mit verschiedenen Detergenzien solubilisiertes Protein der PPO Aktivität enthaltenden Membranfraktion. Durchgeführt wurde der Standardenzymtest (siehe 3.6.9) mit Fumarat (blau), mit TTC (grün) und ohne Elektronenakzeptor (rot). B, Das 10 %ige Coomassie Brilliant Blau gefärbte SDS-Gel zeigt die Membranfraktion (Bahn 1), das mit 3 % Triton X100 (Bahn 2) und mit 0,3 % Triton X100 (Bahn 3) solubilierte Protein sowie das nicht solubilierte Protein nach Behandlung mit 3 % Triton X100 (Bahn 4) und mit 0,3 % Triton X100 (5). Bahn M zeigt die Proteine des Proteinmarkers (Fermentas). Die relative Masse ($\times 10^3$) ist angegeben.

4.3.4.2 Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase über Anionenaustausch Chromatographie an DEAE Sepharose FF

Im nächsten Reinigungsschritt erfolgte die Auftrennung der mit 0,3 % Triton X100 solubilisierten Proteine über eine Säule mit DEAE Sepharose FF. Dabei wurden die Proteine ohne Anwesenheit von Salz aufgetragen und dann in mehreren Teilschritten nacheinander mit 100 mM, 150 mM, 200 mM und 500 mM NaCl eluiert (Abb. 29). Im Anschluss wurden sämtliche Fraktionen auf Protogen Oxidase Aktivität überprüft. Ausschließlich die mit 150 mM NaCl eluierten Proteinfraktionen waren in der Lage Protogen zu oxidieren, wobei in Aktivitätstests sowohl Fumarat als auch TTC als Elektronenakzeptor fungierten. Die nach 20 min gemessene Bildung von Proto durch diese Proteine betrug 226 pmol/ mg Protein mit Fumarat als Elektronenakzeptor. Im Vergleich mit der ein Reinigungsschritt früher gemessenen Aktivität der solubilisierten Proteine von 340,5 pmol Proto/ mg Protein entspricht das einer Verringerung der Protogen Oxidase Aktivität (siehe Tab. 7 Seite 77). Wird der Aktivitätstest allerdings mit TTC als Elektronenakzeptor durchgeführt, dann entspricht die gemessene Aktivität der von der Säule eluierten Proteine mit 250,7 pmol Proto/ mg Protein einer zweifachen Steigerung gegenüber der solubilisierten Proteine (siehe Tab. 7 Seite 77). Grund für die unterschiedlichen Protogen Oxidase Aktivitäten ist wahrscheinlich der durch die Anionenaustausch Chromatographie verursachte Verlust von Teilen des in der Membran lokalisierten Elektronentransportsystems der Fumarat Reduktase. Deswegen dürfte die Übertragung der Elektronen von der Protoporphyrinogen Oxidase auf das Fumarat, mittels Fumarat Reduktase, im Gegensatz zur direkten Übertragung auf TTC erschwert sein.

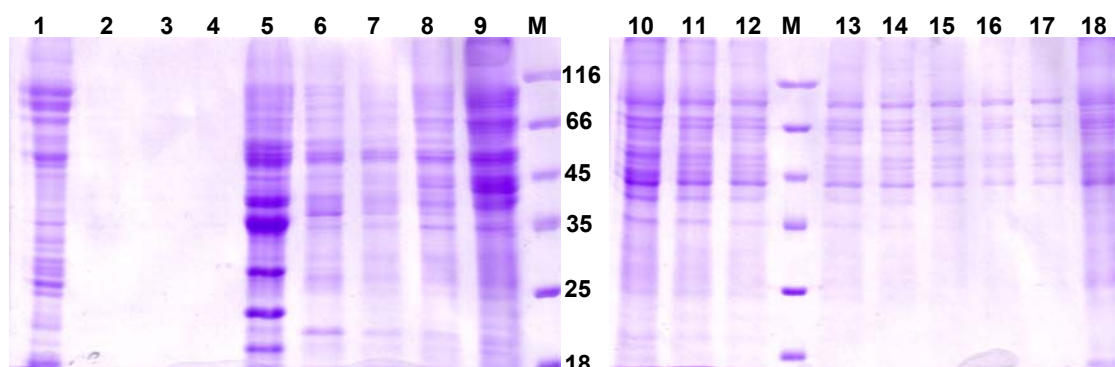


Abbildung 29: 10 %iges Coomassie Brilliant Blau gefärbte SDS-Gel der Säulenchromatographie der aus der Membranfraktion von *E. coli* solubilisierten Proteine über DEAE Sepharose FF. Bahnen 1-4 zeigen die verschiedenen Fraktionen des Durchlaufs, Bahnen 5-7 die Proteinfraktionen mit 100 mM NaCl eluiert, Bahnen 8-17 die Proteinfraktionen mit 150 mM NaCl eluiert und Bahn 18 die Proteinfraktion mit 500 mM NaCl eluiert. Bahn M zeigt die Proteine des Proteinmarkers (Fermentas). Die relative Masse ($\times 10^3$) ist angegeben.

4.3.4.3 Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase über Kationenaustausch Chromatographie an CM Sepharose FF und SP Sepharose FF sowie über Blue Sepharose FF

Ausgehend von den aktiven, von der DEAE Sepharose FF eluierten, Proteinfractionen wurden zwei unterschiedliche Reinigungswege eingeschlagen. Der erste Weg führte über zwei Kationentauscher. Dabei wurden 4 mg Protein zuerst über eine 1 ml Tropfsäule des schwachen Kationentauschers CM Sepharose FF aufgetrennt. Ein geringer Teil der Proteine interagiert mit der Säule und wurde später mit NaCl eluiert. Der größere Teil der Proteine, und damit auch die Protoporphyrinogen oxidierenden Enzyme, konnte nicht an das Säulenmaterial binden, wurde im Durchlauf wieder gefunden und im Anschluss über eine 1 ml Tropfsäule, des starken Kationentauschers SP Sepharose FF aufgetrennt. Die mit 500 mM NaCl eluierten Proteine waren in der Lage Protogen zu oxidieren und wurden deshalb in einem letzten Reinigungsschritt auf 1 ml Blue Sepharose FF aufgetragen, wo sie ebenfalls mit dem Säulenmaterial interagierten (Abb. 30). Die mit 500 mM NaCl eluierte Proteinfraction besaß unter Verwendung von TTC als Elektronenakzeptor immer noch eine geringe Protogen Oxidase Aktivität. Diese Proteine (Fraction PPOA) wurden für die anschließenden massenspektrometrischen Untersuchungen weiterverwendet.

Beim zweiten Reinigungsversuch wurden von den von der DEAE Sepharose FF eluierten Proteine die fünffache Menge (22 mg) direkt auf eine 5 ml Tropfsäule des starken Kationentauschers SP Sepharose FF aufgetragen. Nach der Auftrennung der Proteine konnte Protogen Oxidase Aktivität in den Fractionen mit 50 mM (Fraction PPOB) und 500 mM NaCl nachgewiesen werden, wobei sowohl Fumarat als auch TTC als Elektronenakzeptor verwendet werden konnten (Tab. 7 Seite 77). Die mit 500 mM NaCl eluierten Proteine wurden anschließend über 1 ml Blue Sepharose FF gereinigt. Hierbei interagierten die aktiven Proteinfractionen mit dem Säulenmaterial und konnten mit 500 mM (Fraction PPOC) und 1 mM NaCl (Fraction PPOD) eluiert werden (Abb. 30). Die Proteinfraction PPOB, PPOC und PPOD wurden für anschließende Untersuchung via Massenspektrometrie weiterverwendet.

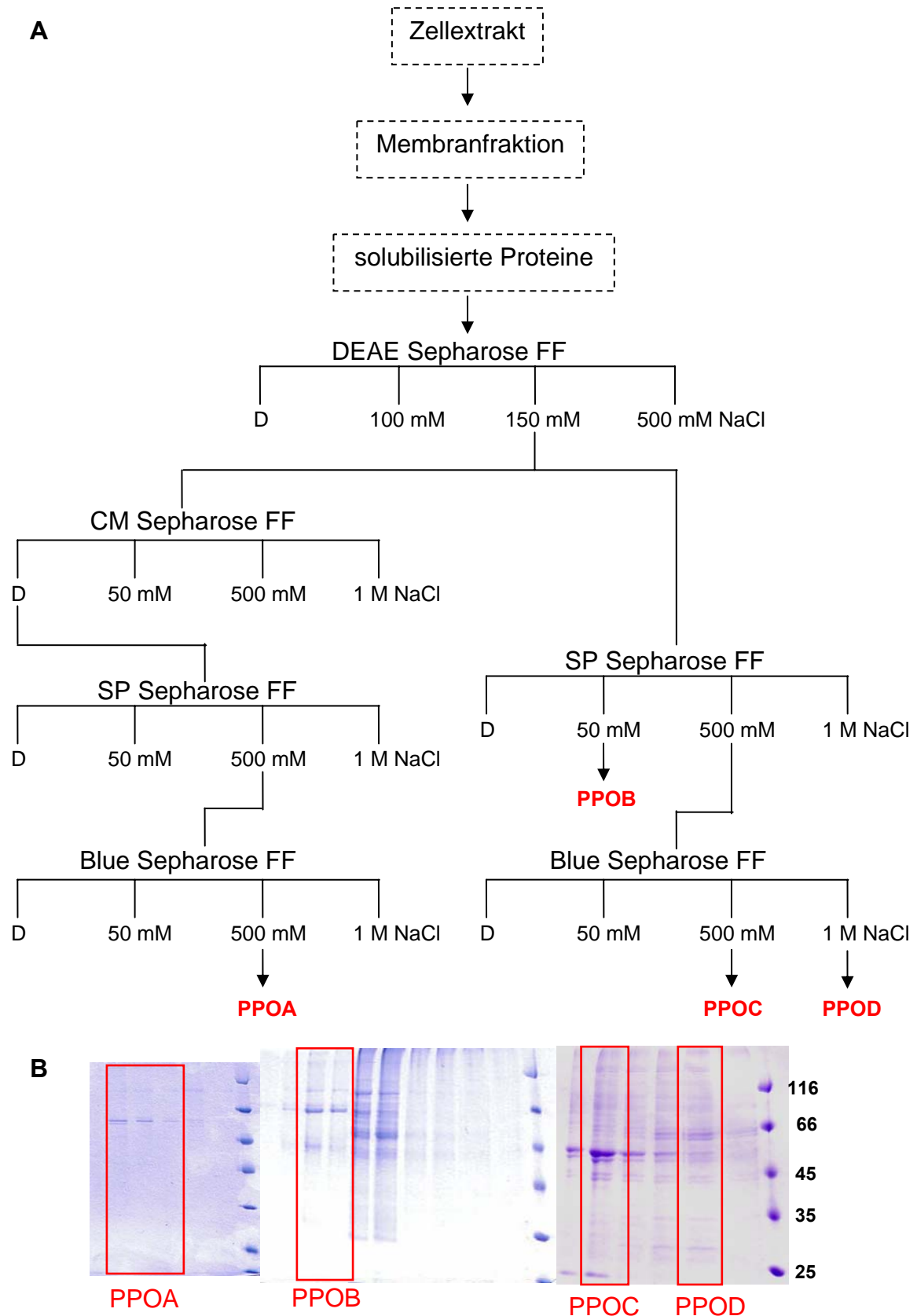


Abbildung 30: Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *E. coli*. **A**, Dargestellt sind die, wie unter 3.6.8 beschriebenen, chromatographischen Schritte. D, Durchlauf. **B**, Das 10 %ige Coomassie Brilliant Blau gefärbte SDS-Gel zeigt die angereicherten Proteine. Rot umrahmt sind die Fraktionen PPOA, PPOB, PPOC und PPOD, welche für Untersuchungen mittels Massenspektrometrie weiterverwendet wurden. Die relative Masse ($\times 10^3$) der Proteine des Proteinmarkers (Fermentas) ist angegeben.

4.3.4.4 Zusammenfassung der Reinigungsschritte

Die Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase wurde ausgehend vom *E. coli* Zellextrakt unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt. Aus dem Zellextrakt wurde die Membranfraktion isoliert und daraus die Proteine solubilisiert, welche anschließend säulenchromatographisch gereinigt wurden (Tab. 7). Bei jedem Reinigungsschritt wurden die Proteinfractionen auf Protogen Oxidase Aktivität hin überprüft, wobei entweder Fumarat, TTC oder kein Elektronenakzeptor verwendet wurde. Anhand der steigenden Menge von pmol Proto/ mg Protein konnte die Anreicherung des gesuchten Enzyms in jedem Reinigungsschritt gut verfolgt werden. Entgegen der Erwartung funktionierte das Enzymtestsystem sowohl ohne Elektronenakzeptor als auch mit Fumarat bis zum letzten Reinigungsschritt (Tab. 7). Ausgehend von der Theorie der Elektronenübertragung von der Protoporphyrinogen IX Oxidase auf die Fumarat Reduktase sollte sich das Verhältnis der Protogen Oxidase Aktivitäten mit den beiden Elektronenakzeptoren im Laufe der Anreicherung umkehren. Aufgrund des vermutlichen Verlustes von Teilen des Proteinkomplexes während der Reinigungsprozedur wird die Übertragung von Elektronen auf Fumarat erschwert. Die direkte Übertragung von Elektronen auf TTC sollte immer gleich gut funktionieren und damit das bessere Aktivitätstestsystem darstellen. Damit übereinstimmend besaßen die höchste Aktivität am Anfang der Zellextrakt, die Membranfraktion sowie die solubilisierten Proteine mit Fumarat (Tab. 7) und nach der ersten säulenchromatographischen Auftrennung über DEAE Sepharose FF der TTC enthaltende Enzymtestansatz (Tab. 7). Die Aktivität dieser Proteinfractionen ohne Elektronenakzeptor war entsprechend kleiner. Ein von der oben genannten Theorie teilweise abweichendes Verhalten konnte ab der über SP Sepharose FF gereinigten Fraktion (PPOB, Tab. 7) beobachtet werden. Hier schon ist eine sehr starke Protogen Oxidase Aktivität auch ohne Elektronenakzeptor festzustellen, was darin resultierte, dass das oben beschriebene Verhältnis nicht mehr stimmte. Auffällig ist die unterschiedliche Protogen Oxidase Aktivität der letzten Fraktionen PPOC und PPOD, die beide ausgehend von der gleichen, von SP Sepharose FF eluierten, Proteinfraction (siehe Abb. 30) aufgetrennt wurden. Die Protogen Oxidase Aktivität der Fraktion PPOC verhält sich entsprechend den Erwartungen bei einer Übertragung der Elektronen auf die Fumarat Reduktase. Bei der Fraktion PPOD (Tab. 7) allerdings ist zu beobachten, dass die Protogen Oxidase Aktivität ohne Elektronenakzeptor am stärksten zu sein scheint und durch Zugabe von entweder Fumarat oder TTC sogar inhibiert wird. Das könnte darauf schließen lassen,

dass es sich bei dieser Probe nicht um das in dieser Arbeit schon genauer beschriebene Enzymsystem handelt, welches die Elektronen von Protoporphyrinogen IX auf die Fumarat Reduktase überträgt. Möglicherweise wurden aus *E. coli* zwei verschiedene Enzymsysteme angereichert, von denen eines die Fähigkeit zur Oxidation von Protoporphyrinogen IX besitzt, dabei unabhängig von den hier verwendeten Elektronenakzeptoren ist und/ oder andere Cofaktoren verwendet.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Reinigung der sauerstoffunabhängigen Protogen Oxidase aus *E. coli*

Reinigungsschritt	Gesamt- Volumen	Gesamt- Protein	Spezifische Aktivität ^A			Gesamt- Aktivität		Reinigungs- faktor
			TTC	Fumarat	---	TTC	TTC	
	[ml]	[mg]	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]	[U] ^B	[%]	
Zellextrakt	29	1212	0,7	1,6	0,33	848,4		
Membranfraktion	17	135	10,7	97,2	6,5	1444,5	170	15
Solubilisiertes Protein	22	80	122,9	340,5	18,7	9832	1159	176
DEAE Sepharose FF	27	22	250,7	207,2	196,4	5515,4	650	358
SP Sepharose FF PPOB	9	1,4	321,4	521,9	454,6	450	53	459
Blue Sepharose FF PPOC	3	0,73	340,9	335,3	61,5	248,9	29	487
Blue Sepharose FF PPOD	3	0,57	1019,3	693,5	1509,2	581	68	1456

^A Der Standardenzymtest (3.6.9) mit dem jeweiligen Elektronenakzeptor wurde durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde als Unit der PPO Aktivität pro mg Protein definiert.

^B Ein Unit der Aktivität entspricht einem pmol produziertem Proto nach 20 min Inkubationsdauer.

4.3.5 Massenspektrometrische Analyse der gereinigten Proteinfractionen

Die Bestimmung der Proteine in den säulenchromatographisch gereinigten Fraktionen PPOA, PPOB, PPOC und PPOD erfolgte mittels Massenspektrometrie an der GBF mit freundlicher Hilfe von Dr. Lothar Jänsch. Tabelle 8 zeigt alle Proteine, die in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen wurden. Neben den vielen Enzymen mit bekannter Funktion konnten zwei Proteine identifiziert werden, die eine bis jetzt noch unbekannte Funktion besitzen. Dabei handelt es sich zum einen um das hypothetische Protein YqjD, von dem allerdings nur ein Peptid in der Probe PPOD nachgewiesen werden konnte. Mit jeweils einem Peptid in der Probe PPOA und PPOD wurde das hypothetische Membranprotein YijP identifiziert (Tab. 8). Bis auf diese zwei Proteine, deren Funktion als Protogen Oxidase aus verschiedenen, im Folgenden näher beschriebenen Gründen fraglich ist, konnten keine weiteren in Frage kommenden Proteine identifiziert werden. Eine Ursache könnte in einer sehr hohen Sensitivität des Enzymtestsystems liegen, was die Detektion von schon sehr geringen, für die Massenspektrometrie nicht ausreichenden, Mengen der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase ermöglicht. Eine weitere Anreicherung der Proteine könnte hier zum Erfolg führen. Aufgrund des für die MS - Analysen störenden Triton X100 wurden die Proben vor der MS - Analyse über eine kurze Strecke der SDS-PAGE aufgetrennt, ein Proteinblock mit den sichtbaren Banden ausgeschnitten und via Massenspektrometrie analysiert. Es ist davon auszugehen, dass bei dieser Methode gerade kleinere oder gering konzentrierte Proteine, darunter eventuell die sauerstoffunabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase, verloren gegangen sind. In späteren Arbeiten sollte die Wahl des Detergenz diesbezüglich noch einmal überdacht werden. Womöglich finden sich andere Methoden um Proteine aus der Membran zu lösen, bei denen das gewählte Solubilisierungsmittel weniger störend auf die Massenspektrometrie einwirkt.

Tabelle 8: Massenspektrometrische Analyse der säulenchromatographisch angereicherten Proteinfractionen mit sauerstoffunabhängiger PPO Aktivität.

	Gen- Name	Molekulare Masse [kD]	PPO A ^A	PPO B ^A	PPO C ^A	PPO D ^A
Chaperon ClpB	<i>clpB</i>	95,5	13	1	12	24
Lysyl-tRNA Synthetase	<i>lysU</i>	57,6	1	17	2	21
Trigger Faktor	<i>tig</i>	48,2	16		16	
Elongationsfaktor Ef-Tu	<i>tufA</i>	43,1	6	3	8	14
Lipoamid Dehydrogenase	<i>lpdA</i>	50	18		11	7
IMP Dehydrogenase	<i>guaB</i>	52			11	3
Glycerolphosphat Dehydrogenase	<i>glpD</i>	56,7			2	7
Lactat Dehydrogenase	<i>dld</i>	64,2				7
Enolase	<i>eno</i>	45,5	7	6	2	4
Format-Acyltransferase	<i>pflB</i>	70	5	4		
Aldehydalkohol Dehydrogenase	<i>adhE</i>	96				4
arcA – Regulator der aeroben Atmung	<i>arcA</i>	27,3				4
cpxR – transkriptioneller Regulator	<i>cpxR</i>	26,2				4
<u>ATP-Synthase</u>						
F0 B UE	<i>atpF</i>	17,3	1			
Alpha UE	<i>atpA</i>	55,4	3		1	5
F1 Beta UE	<i>atpD</i>	50,3				2
Gamma UE	<i>atpG</i>	31,5				2
Glutamyl-tRNA Synthetase	<i>gltX</i>	53,7	2		2	
Pyruvat Dehydrogenase	<i>aceE</i>	99,5	1			2
<u>NADH Dehydrogenase</u>						
UE F	<i>nuoF</i>	49,3	4			
UE G	<i>nuoG</i>	102,5	2			
Histidyl-tRNA Synthetase	<i>hisS</i>	46,9			2	2
DNA-Bindeprotein HU-alpha	<i>hupA</i>	9,5				1
DNA-Bindeprotein HU-beta	<i>hupB</i>	9,2				2
Phosphat Acetyltransferase	<i>pta</i>	76,9	2		2	2
Glycyl-tRNA Synthetase	<i>glyS</i>	76,6	2			
Fructosebisphosphat Aldolase	<i>fbaB</i>	40		1		
mögliche 3-Oxoacyl Reductase	<i>fabG</i>	9,3		1		
PTS Enzym, IIAB	<i>manX</i>	34,3	2			3
S1 ribosomales Protein	<i>rpsA</i>	61		2		2
YQJD – unbekannte Funktion	<i>yqjD</i>	11,05				1
YLJP – unbekannte Funktion	<i>yijP</i>	66,6	1			1
Cytochrom Oxidase d, UE I	<i>cydA</i>	58,1				1
Prolyl-tRNA Synthetase	<i>proS</i>	63,6				1
Bacterioferritin	<i>bcp</i>	17,6		1		
Carbon storage Regulator	<i>csrA</i>	7,9				1
mögliche Tagatose 6-Phosphat Kinase	<i>gatZ</i>	47				1
Isocitrat Dehydrogenase	<i>icdA</i>	45,5	1		1	
Uridin Phosphorylase	<i>udp</i>	27		1		

^A Angegeben ist die Menge der in den einzelnen Proteinfractionen gefundenen Peptide des jeweiligen Proteins.

4.3.5.1 Das hypothetische Protein YqjD

Bei YqjD handelt es sich um ein hypothetisches Protein mit bis jetzt noch unbekannter Funktion. Das Gen *yqjD* kodiert für ein relativ kleines Protein mit einer Masse von 11050 Da und ist flankiert von Genen, die ebenfalls für sehr kleine, hypothetische Proteine (YqjC: $M_r = 14500$; YqjE: $M_r = 15500$; YqjK: $M_r = 11800$) mit unbekannter Funktion kodieren (Abb. 31). Die Anordnung der drei Gene *yqjD*, *yqjE* und *yqjK* könnte dabei einem Operon entsprechen und auf ein komplexes Protein mit mehreren Untereinheiten hindeuten. Bereits Klemm und Mitarbeiter isolierten 1987 eine mögliche Protogen Oxidase als aus drei Untereinheiten bestehenden Proteinkomplex, deren relative Massen allerdings von den relativen Massen der hier betrachteten hypothetischen Proteine abweichen. Die Auswertung der Proteinsequenz von YqjD mit Hilfe der NCBI Datenbank ergab keinerlei Übereinstimmungen mit konservierten Domänen anderer Proteine, welche auf eine Elektronen übertragende Funktion hindeuten könnten. Die mögliche Funktion der Protogen Oxidase bei der Übertragung der Elektronen von Protoporphyrinogen IX letztendlich auf Fumarat machte solch eine Untersuchung sinnvoll. Zu YqjD homologe Proteine finden sich nur in der Gruppe der Enterobakterien (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Erwinia carotovora*, *Photorhabdus luminescens*), wobei die Gene ebenfalls in einem Operon mit zwei weiteren Genen angeordnet sind, von denen bisher noch keine Funktion bekannt ist. Die Katalyse der sauerstoffunabhängigen Oxidation von Protoporphyrinogen IX findet wahrscheinlich in einer großen Zahl von Bakteriengruppen statt. Ein Enzym, das diese Reaktion katalysiert, sollte dementsprechend konserviert sein. Die Tatsache, dass YqjD nur in einer Bakteriengruppe auftritt macht eine ubiquitäre Funktion dieses Proteins als anaerobe Protogen Oxidase unwahrscheinlich. Da stellt sich nun die Frage, ob YqjD eine ganz andere Funktion besitzt oder ob die Gruppe der Enterobakterien ein eigenes System für die Protogen Oxidation entwickelt hat.

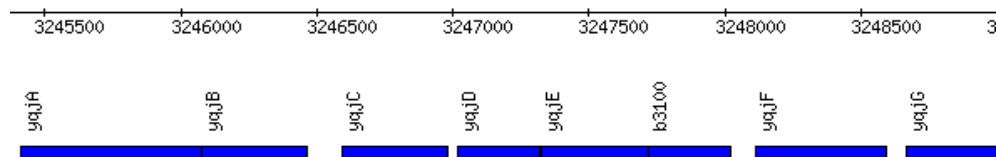


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Genregion um *yqjD* des Stammes *E. coli* K-12. b3100, *yqjK*; Quelle: PRODORIC

4.3.5.2 Das hypothetische Protein YijP

Bei YijP handelt es sich um ein Membranprotein mit bis jetzt noch unbekannter Funktion. Das Gen *yijP* kodiert für ein Protein mit der relativen Masse von 66669 und wird stromaufwärts von dem Gen für die Phosphoenolpyruvat Carboxylase (*ppc*) und stromabwärts von dem Gen für ein mögliches regulatorisches Protein (*yijO*) flankiert (Abb. 32). Eine Operonstruktur scheint hier nicht erkennbar zu sein. Die Auswertung der Proteinsequenz von YijP mit Hilfe der NCBI Datenbank ergab Übereinstimmungen mit Domänen der Sulfatase, einer vorhergesagten Permease, einer vorhergesagten Metall abhängigen Hydrolase und einer Transferase (Abb. 33). Dabei fanden sich erneut keine Domänen von Enzymen, die mit Beteiligung von entsprechenden Cofaktoren an der Elektronenübertragung beteiligt sind, was für die Protogen Oxidase sicherlich zu erwarten ist. Zu YijP homologe Proteine finden sich vor allem in der Gruppe der Proteobakterien, darunter auch wieder bei den Enterobakterien, und bei der CFB Bakteriengruppe. Innerhalb der Gram positiven Bakterien wurde bei der Datenbankanalyse kein YijP Homolog gefunden. Auch das entspricht nicht den Erwartungen von einem Enzym das über alle Gruppen von bakteriellen Organismen verteilt ist. Deletions- und Komplementationsexperimente weisen auf eine Beteiligung des *yijP* Gens bei der Invasion von *E. coli* K1 über die Blut-Hirn Schranke hin (Wang *et al.*, 1999), was ein weiteres Indiz dafür ist, dass es sich bei YijP nicht um die sauerstoffunabhängige Protoporphyrinogen IX Oxidase handelt.

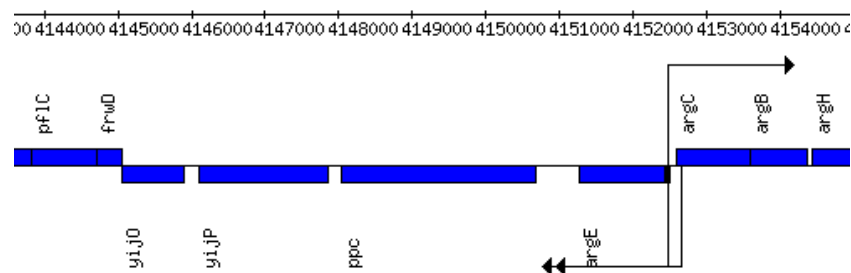


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Genregion um *yijP* des Stammes *E. coli* K-12. Quelle: PRODORIC.

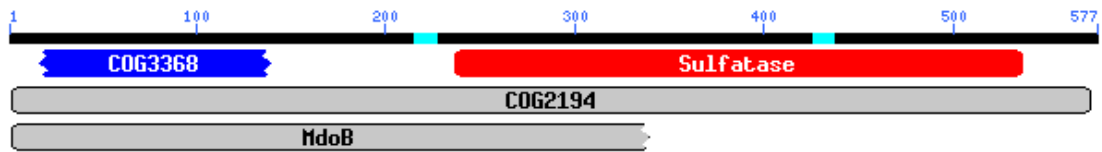


Abbildung 33: Schematische Darstellung des Ergebnisses der Suche nach konservierten Domänen von YijP mit Hilfe der NCBI Datenbank. COG3368, vorhergesagte Permease; COG2194, vorhergesagte Membran assoziierte, Metall abhängige Hydrolase; MdoB, Phosphoglycerol Transferase und verwandte Proteine, Alkalische Phosphatase Superfamilie (Biogenese der Zellhülle, äußere Membran).

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Tetrapyrrol Biosynthese katalysieren die Coproporphyrinogen III Oxidasen (CPO) die oxidative Decarboxylierung von zwei Propionatresten des Coproporphyrinogen III zu den entsprechenden Vinylgruppen. Das dabei gebildete Protoporphyrinogen IX wird wiederum durch Protoporphyrinogen IX Oxidasen (PPO) zum vollständig konjugierten Protoporphyrin IX oxidiert. Für beide Katalyseschritte existieren je zwei unterschiedliche Enzyme, die entweder mit Nutzung von Sauerstoff oder ohne Sauerstoff arbeiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sauerstoffabhängige CPO (HemF) aus *E. coli* rekombinant produziert und chromatographisch gereinigt. Es konnte eine Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms von Mangan gezeigt werden. Mutagenesestudien identifizierten die Aminosäuren H96, H106, H145 und H175 als bedeutsam für die Katalyse. Mit Hilfe von Methoden wie ESR, Atomabsorption und UV/VIS - Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass H106 an der Manganbindung und H175 entweder an der Mangan- oder an der Substratbindung beteiligt sind. Als ein Produkt der enzymatischen Reaktion konnte neben Protoporphyrinogen IX Wasserstoffperoxid identifiziert werden. Ein Enzymmechanismus unter Beteiligung von Manganionen wurde abgeleitet.

Über die sauerstoffunabhängige PPO war bis zu dieser Arbeit fast nichts bekannt. Das Produkt des bisher in diesem Zusammenhang isolierten und nur in *Enterobacteriaceae* gefundenen *hemG* Gens besitzt für sich alleine keine PPO Aktivität. In dieser Arbeit konnte ein Enzymtest für diese PPO etabliert werden. Die *E. coli* PPO ist ein membranständiges Enzym, dessen Aktivität mit der Atmungskette gekoppelt ist. Eine Elektronenübertragung von der PPO auf die Fumarat Reduktase und die Beteiligung von HemG daran konnte nachgewiesen werden. Ausgehend von den aus der *E. coli* Membranfraktion solubilisierten Proteinen wurde eine erste säulenchromatographische Reinigung der Protoporphyrinogen IX Oxidase durchgeführt. Dabei wurde eine 1456fache Anreicherung der PPO Aktivität durch Chromatographie über DEAE Sepharose FF, CM Sepharose FF, SP Sepharose FF und Blue Sepharose FF erreicht. Durch massenspektrometrische Untersuchung der erhaltenen Fraktionen wurden bisher noch keine überzeugenden Kandidaten für zugehörige Proteine gewonnen. Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein Beitrag zum Verständnis des bisher ungeklärten Mechanismus der sauerstoffabhängigen CPO und zur Funktion und Identität der bisher völlig unbekannten sauerstoffunabhängigen PPO geleistet.

6 Ausblick

Für die genaue Aufklärung des Enzymmechanismus von HemF wären weitere Kristallisationsexperimente und die anschließende röntgenographische Untersuchung der Kristalle wichtig. Dazu sollten zusätzliche Konstrukte des *Thermosynechococcus elongatus hemF* kloniert werden um anschließend lösliches Protein reinigen und kristallisieren zu können. Die bisher gelöste Kristallstruktur des Hefe HemF hat weder Cofaktoren noch Substrat gebunden und erlaubt keine genauere Beschreibung des Enzymmechanismus. Daher sollte demnächst die Co - Kristallisation mit Substrat, Inhibitoren und/oder Mangan durchgeführt werden.

Für eine Charakterisierung der sauerstoffunabhängigen Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *E. coli* muss zunächst das Reinigungsschema optimiert werden. Dabei bieten sich eine ganze Reihe von Möglichkeiten. Um den Anteil von zytoplasmatischen Proteinen zu verringern, können z.B. die Methode zur Isolierung der Membranfraktion oder das Detergenz, welches für die Solubilisierung der Proteine verwendet wird, variiert werden. Eventuell wird durch besseres Waschen der verwendeten Ionentauscher und/oder Verkleinerung der Elutionsschritte mit NaCl der Anteil an Membranproteinen erhöht.

Zur Isolierung des nativen, PPO enthaltenden, Enzymkomplexes eignet sich eventuell auch die Blue Native PAGE. Die Herstellung von Antikörpern, z.B. gegen HemG oder die Fumarat Reduktase, bietet sich hier für die Detektion des Komplexes im Gel an.

Die Reinigung der PPO aus anderen Mikroorganismen und der anschließende Vergleich mit der *E. coli* PPO sollten weitere Aufschlüsse darüber geben, ob es mehrere Enzymsysteme mit verschiedenen Elektronenakzeptoren oder nur einen weit verbreiteten, universellen Enzymkomplex gibt.

Durch Mutagenese der Proteine YQJD und YIJP muss deren mögliche Funktion der Protoporphyrinogen IX Oxidase Reaktion geklärt werden.

7 Literatur und Internet - Adressen

7.1 Literatur

Akhtar, M. (1994) The biosynthesis of the tetrapyrrole pigments (P. M. Jordan, ed.), pp131-155, Wiley, Chichester.

Astner, I., Schulze, J. O., van den Heuvel, J., Jahn, D., Schubert, W. D. & Heinz, D. W. (2005) Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. *EMBO J.* 24, 3166-3177.

Beale, S. I. & Castelfranco, P. A. (1973) ^{14}C incorporation from exogenous compounds into δ -aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 143-149.

Blaut, M., Whittaker, K., Valdovinos, A., Ackrell, B. A. C., Gunsalus, R. P. & Cecchini, G. (1989) Fumarate Reductase Mutants of *Escherichia coli* That Lack Covalently Bound Flavin. *J. Biol. Chem.* 264, 13599-13604.

Camadro, J. M., Chambon, H., Jolles, J. & Labbe, P. (1986) Purification and properties of coproporphyrinogen oxidase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 156, 579-587.

Camadro, J. M., Thome, F., Brouillet, N. & Labbe, P. (1994) Purification and Properties of Protoporphyrinogen Oxidase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial Location and Evidence for a Precursor Form of the Protein. *J. Biol. Chem.* 269, 32085-32091.

Chadwick, D. J., Ackrill, K. (eds.). (1994). *The Biosynthesis of Tetrapyrrole Pigments*. Ciba Foundation Symposia, 180, Wiley and Sons, Chichester, UK.

Cecchini, G., Schröder, I., Gunsalus, R. P. & Maklashina, E. (2002) Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1553, 140-157.

Cecchini, G., Maklashina, E., Yankovskaya, V., Iverson, T. M. & Iwata, S. (2003) Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett.* 545, 31-38.

Colloc'h, N., Hajji, M. E., Bachet, B., L'Hermite, G., Schiltz, M., Prange, T., Castro, B. & Mornon, J. P. (1997) Crystal Structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4, 947-952.

Colloc'h, N., Mornon, J. P. & Camadro, J. M. (2002) Towards a new T-fold protein?: The coproporphyrinogen III oxidase sequence matches many structural features from urate oxidase. *FEBS Lett.* 526, 5-10.

Corrigall, A. V., Siziba, K. B., Maneli, M. H., Shephard, E. G., Ziman, M., Dailey, T. A., Dailey, H. A., Kirsch, R. E. & Meissner, P. N. (1998) Purification of and Kinetic Studies on a Cloned Protoporphyrinogen Oxidase from the Aerobic Bacterium *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 358, 251-256.

Crowley, J. D., Traynor, D. A. & Weatherburn, D. C. (2000) In *Metal ions in biological systems: manganese and its role in biological systems, vol 37* (Sigel, A. & Sigel, H. eds.), pp. 209-278, Marcel Dekker, New York.

Dailey, H. A. (1990) In *Biosynthesis of heme and chlorophyll: Conversion of coproporphyrinogen to proto hem in higher eukaryotes and bacteria: terminal three enzymes*. (Dailey, H. A. ed.), pp. 132-162, McGraw-Hill, New York.

Dailey, H. A. & Dailey, T. A. (1996) Protoporphyrinogen Oxidase of *Myxococcus xanthus*. Expression, Purification, and Characterization of the Cloned Enzyme. *J. Biol. Chem.* 271, 8714-8718.

Dailey, T. A., Meissner, P. & Dailey, H. A. (1994) Expression of a Cloned Protoporphyrinogen Oxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 813-815.

Dailey, T. A. & Dailey, H. A. (1998) Identification of an FAD Superfamily Containing Protoporphyrinogen Oxidases, Monoamine Oxidases and Phytoene Desaturase. *J. Biol. Chem.* 273, 13658-13662.

Darwin, A.J. & Stewart, V. (1996) The NAR Modulon Systems: Nitrate and Nitrite Regulation of Anaerobic Gene Expression. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*, edited by E. C. C. Lin and A. Simon, Lynch. ©, R.G. Landes Company, pp. 343-359.

Deybach, J. C., Da Silva, V., Grandchamp, B. & Nordmann, Y (1985) The mitochondrial location of protoporphyrinogen oxidase. *Eur. J. Biochem.* 149, 431-435.

Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids res.* 16, 6127-6145.

Elder, G. H. & Evans, J. O. (1978) Evidence that the coproporphyrinogen oxidase activity of rat liver is situated in the intermembrane space of mitochondria. *Biochem. J.* 172, 345-347.

Ferreira, G. C., Andrew, T. L., Karr, S. W. & Dailey, H. (1988) Organization of the Terminal Two Enzymes of the Heme Biosynthetic Pathway. Orientation of Protoporphyrinogen Oxidase and Evidence for a Membrane Complex. *J. Biol. Chem.* 263, 3835-3839.

Fetzner, S. (2002) Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 60, 243-257.

Frankenberg, N., Erskine, P. T., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D. & Heinz, D. W. (1999a) High Resolution Crystal Structure of a Mg^{2+} -dependent Porphobilinogen Synthase. *J. Mol. Biol.* 289, 591-602.

Frankenberg, N., Heinz, D. & Jahn, D. (1999b) Production, Purification, and Characterization of a Mg^{2+} -Responsive Porphobilinogen Synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 38, 13968-13975.

Frankenberg, N., Jahn, D. & Jaffee, E. K. (1999c) *Pseudomonas aeruginosa* Contains a Novel Type V Porphobilinogen Synthase with No Required Catalytic Metal Ions. *Biochemistry* 38, 13976-13982.

Frankenberg, N., Moser, J. & Jahn, D. (2003) Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 115-127.

Grandchamp, B., Phung, N. & Nordmann, Y. (1978) The mitochondrial localization of coproporphyrinogen III oxidase. *Biochem. J.* 176, 97-102.

Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1982) Coproporphyrinogen III oxidase assay. *Enzyme* 28, 196-205.

Guest, J.R., Green, J., Irvine, A.S. & Spiro, S. (1996) The FNR Modulon and FNR-Regulated Gene Expression. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*, edited by E. C. C. Lin and A. Simon, Lynch. ©, R.G. Landes Company, pp. 317-342.

Gunsalus, R.P. (1992) Control of Electron Flow in *Escherichia coli*: Coordinated Transcription of Respiratory Pathway Genes. *J. Bacteriol.* 174, 7069-7074.

Gunsalus, R.P. & Park, S.J. (1994) Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Res. Microbiol.* 145, 437-450.

Hansson, M. & Hederstedt, L. (1992) Cloning and Characterization of the *Bacillus subtilis* *hemEHY* Gene Cluster, Which Encodes Protoheme IX Biosynthetic Enzymes. *J. Biol. Chem.* 174, 8081-8093.

Hansson, M. & Hederstedt, L. (1994) *Bacillus subtilis* HemY Is a Periplasmic Membrane Protein Essential for Protoheme IX Synthesis Which Can Oxidize Coproporphyrinogen III and Protoporphyrinogen IX. *J. Biol. Chem.* 176, 5962-5970.

Homuth, G., Rompf, A., Schumann, W. & Jahn, D. (1999) Transcriptional Control of *Bacillus subtilis* *hemN* and *hemZ*. *J. Bacteriol.* 181, 5922-5929.

Hsu, W. P. & Miller, G. W. (1970) Coproporphyrinogenase in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Biochem. J.* 117, 215-220.

Ilag, L. L. & Jahn, D. (1992) Activity and Spectroscopic Properties of the *Escherichia coli* Glutamate 1-Semialdehyde Aminotransferase and the Putative Active Site Mutant K256R. *Biochemistry* 31, 7143-7151.

Jackson, A. H., Jones, D. M., Philip, G., Lash, T. D. & DEL C. Batlle & Smith, S. G. (1980) Synthetic and biosynthetic studies of porphyrins, part IV. *Int. J. Biochem.* 12, 681-688.

Jacobs, N. J. & Jacobs, J. M. (1975) Fumarate As Alternate Electron Acceptor For The Late Steps Of Anaerobic Heme Synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 435-441.

Jacobs, N. J. & Jacobs, J. M. (1976) Nitrate, Fumarate, and Oxygen as Electron Acceptors For a Late Step in Microbial Heme Synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 449, 1-9.

Jacobs, N. J. & Jacobs, J. M. (1977a) Evidence For Involvement of The Electron Transport System At a Late Step Of Anaerobic Microbial Heme Synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 459, 141-144.

Jacobs, N. J. & Jacobs, J. M. (1978) Quinones As Hydrogen Carriers For a Late Step In Anaerobic Heme Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 544, 540-546.

Jacobs, N. J. & Jacobs, J. M. (1981) Protoporphyrinogen Oxidation in *Rhodospseudomonas spheroides*, a Step in Heme and Bacteriochlorophyll Synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 305-311.

Jacobs, J. M. & Jacobs, N. J. (1977b) The late steps of anaerobic heme biosynthesis in *E. coli*: role for quinones in protoporphyrinogen oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 429-433.

Jacobs, J. M. & Jacobs, N. J. (1984) Protoporphyrinogen Oxidation, an Enzymatic Step in Heme and Chlorophyll Synthesis: Partial Characterization of the Reaction in Plant Organelles and Comparison with Mammalian and Bacterial Systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 229, 312-319.

Jacobs, J. M. & Jacobs, N. J. (1987) Oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin, a step in chlorophyll and haem biosynthesis. Purification and partial characterization of the enzyme from barley organelles. *Biochem. J.* 244, 219-224.

Jahn, D., Michelsen, U. & Söll, D. (1991a) Two Glutamyl-tRNA Reductase Activities in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266, 2542-2548.

Jahn, D., Chen, M.W. & Söll, D. (1991b) Purification and Functional Characterization of Glutamate-1-semialdehyde Aminotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 266, 161-167.

Jahn, D., Verkamp, E. & Söll, D. (1992) Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17, 215-218.

Jahn, D., Hungerer, C. & Troup, B. (1996) Ungewöhnliche Wege und umweltregulierte Gene der bakteriellen Hämbiosynthese. *Naturwissenschaften* 83, 389-400.

Jordan, P. (1991). Biosynthesis of tetrapyrrois. In *New comprehensive biochemistry*, 19, 1-47 Elsevier, Amsterdam, NL.

Kahn, K. & Tipton, P. A. (1997) Kinetic Mechanism and Cofactor Content of Soybean Root Nodule Urate Oxidase. *Biochemistry* 36, 4731-4738.

Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. & Shemin, D. (1958) The Enzymatic Synthesis of δ -Aminolevulinic Acid. *J. Biol. Chem.* 233, 1214-1219.

Klemm, D. J. & Barton, L. L. (1985) Oxidation of Protoporphyrinogen in the Obligate Anaerobe *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 164, 316-320.

Klemm, D. J. & Barton, L. L. (1987) Purification and Properties of Protoporphyrinogen Oxidase from an Anaerobic Bacterium, *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 169, 5209-5215.

Koch, M, Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R. & Messerschmidt, A. (2004) Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO J.* 23, 1720-1728

Kohno, H., Furukawa, T., Tokunaga, R., Taketani, S. & Yoshinaga, T. (1996) Mouse coproporphyrinogen oxidase is a copper-containing enzyme: expression in *Escherichia coli* and site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1292, 156-162.

Kruse, E., Mock, H. P. & Grimm, B. (1995) Coproporphyrinogen III oxidase from barley and tobacco – sequence analysis and initial expression studies. *Planta* 196, 796-803.

Labbe, P. (1997) Purification and Properties of Coproporphyrinogen III Oxidase from Yeast. *Methods Enzymol.* 281, 367-378.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lane, B. G. (1994) Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB J.* 8, 294-301.

Lash, D. T. (2005) The enigma of coproporphyrinogen oxidase: How does this unusual enzyme carry out oxidative decarboxylations to afford vinyl groups? *Bioorg. Med. Chem. Lett.* [Epub ahead of print].

Layer, G., Verfürth, K., Mahlitz, E. & Jahn, D. (2002) Oxygen-independent Coproporphyrinogen-III Oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277, 34136-34142.

Layer, G., Moser, J., Heinz, D. W., Jahn, D. & Schubert, W. D. (2003) Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes. *EMBO J.* 22, 6214-6224.

Layer, G., Heinz, D. W., Jahn, D. & Schubert, W. D. (2004) Structure and function of radical SAM enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 468-476.

Layer, G. (2004) Struktur und Funktion of the Oxygen-Independent Coproporphyrinogen III Oxidase HemN from *Escherichia coli*. Dissertation Technische Universität Braunschweig.

Layer, G., Grage, K., Teschner, T., Schünemann, V., Breckau, D., Masoumi, A, Jahn, M., Heathcote, P., Trautwein, A.X. & Jahn, D. (2005) Radical S-adenosylmethionine enzyme coproporphyrinogen III oxidase HemN: functional features of the [4Fe-4S] cluster and the two bound S-adenosyl-L-methionines. *J. Biol. Chem.* 280, 29038-29046.

Lermontova, I., Kruse, E., Mock, H. P. & Grimm, B. (1997) Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 8895-8900.

Louie, G. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. B., Blundell, T. L., Wood, S. P., Warren, M. J., Woodcock, S. C. & Jordan, P. M. (1992) Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature* 359, 33-39.

Lüer, C., Schauer, S., Möbius, K., Schulze, J., Schubert, W. D., Heinz, D. W., Jahn, D. & Moser, J. (2005) Complex formation between Glutamyl-tRNA Reductase and Glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the Initial Reactions of Porphyrin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 280, 18568-18572.

Luna-Chavez, C., Iverson, T. M., Rees, D. & Cecchini, G. (2000) Overexpression, Purification, and Crystallization of the Membrane-Bound Fumarate Reductase from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 19, 188-196.

Luo, J. & Lim, C. K. (1993) Order of uroporphyrinogen III decarboxylation on incubation of porphobilinogen and uroporphyrinogen III with erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J.* 289, 529-532.

Macieira, S., Martins, B. M. & Huber, R. (2003) Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase from *Escherichia coli*: one-step purification and biochemical characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 31-37.

Mahlitz, E. (2001) Die sauerstoffabhängige Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) aus *Escherichia coli*. Dissertation Technische Universität Braunschweig.

Medlock, A. E. & Dailey, H. A. (1996) Human Coproporphyrinogen Oxidase Is Not a Metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 271, 32507-32510.

Moser, J., Lorenz, S., Hubschwerlen, C., Rompf, A. & Jahn, D. (1999) *Methanopyrus kandleri* Glutamyl-tRNA Reductase. *J. Biol. Chem.* 274, 30679-30685.

Moser, J., Schubert, W. D., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2001) V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J.* 20, 6583-6590.

Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E. & Jahn, D. (2003) PRODORIC: Prokaryotic Database of Gene Regulation. *Nucleic. Acid Res.* 31, 266-269.

Nishimura, K., Taketani, S. & Inokuchi, H. (1995) Cloning of a Human cDNA for Protoporphyrinogen Oxidase by Complementation *in Vivo* of a *hemG* Mutant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 8076-8080.

O'Brian, M. R. & Thöny-Meyer, L. (2002) Biochemistry, Regulation and Genomics of Haem Biosynthesis in Prokaryotes. *Adv. Microbil. Physiol.* 46, 257-318.

Panek, H. & O'Brian, M. R. (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* 148, 2273-2282.

Phillips, J. D., Whitby, F. G., Warby, C. A., Labbe, P., Yang, C., Pflugrath, J. W., Ferrara, J. D., Robinson, H., Kushnert, J. P. & Hill, C. H. (2004) Crystal Structure of the Oxygen-dependant Coproporphyrinogen Oxidase (Hem13p) of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 38960-38968.

Poulson, R. & Polglase, J. (1975) The Enzymic Conversion of Protoporphyrinogen IX to Protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen Oxidase Activity in Mitochondrial Extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 250, 1269-1274.

Poulson, R. (1976) The Enzymic Conversion of Protoporphyrinogen IX to Protoporphyrin IX in Mammalian Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251, 3730-3733.

Reichard, P. (2002) Ribonucleotide reductases: The Evolution of Allosteric Regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 149-155.

Requena, L. & Bornemann, S. (1999) Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. *Biochem. J.* 343, 185-190.

Rich, P. R., Mischis, L. A., Purton, S. & Wiskich, J. T. (2001) The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 181-187.

Rompf, A., Hungerer, C., Hoffmann, T., Lindenmeyer, M., Römling, U., Groß, U., Doss, M. O., Arai, H., Igarashi, Y. & Jahn, D. (1998) Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *hemF* and *hemN* by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. *Mol. Microbiol.* 29, 985-997.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) In *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sano, S. & Granick, S. (1961) Mitochondrial Coproporphyrinogen Oxidase and Protoporphyrin Formation. *J. Biol. Chem.* 236, 1173-1180.

Sasarman, A., Chartrand, P., Lavoie, M., Tardif, D., Proschek, R. & Lapointe, C. (1979) Mapping of a New *hem* Gene in *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* 113, 297-303.

Sasarman, A., Letowski, J. & Czaika, G., Ramirez, V. & Morais, R. (1993) Nucleotide sequence of the *hemG* gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of *Escherichia coli* K12. *Can. J. Microbiol.* 39, 1155-1161.

Sauerwald, A. (2000) Katalytisch relevante Aminosäurereste der sauerstoffabhängigen Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit Universität Freiburg.

Schauer, S., Chaturved, S., Randau, L., Moser, J., Kitabatake, M., Lorenz, S., Verkamp, E., Schubert, W. D., Nakayashiki, T., Murai, M., Wall, K., Thomann, H. U., Heinz, D. W., Inokuchi, H., Söll, D. & Jahn, D. (2002) *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reductase. Trapping the Thioester Intermediate. *J. Biol. Chem.* 277, 48657-48663.

Seehra, J. S., Jordan, P. M. & Akhtar, M. (1983) Anaerobic and aerobic coproporphyrinogen III oxidases of *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochem. J.* 209, 709-718.

Shemin, D. & Russel, C. (1953) δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4873-4874.

Shoolingin-Jordan, P. M., Spencer, P., Sarwar, M., Erskine, P. E., Cheung, K. M., Cooper, J. B. & Norton, E. B. (2002) 5-Aminolävulinic acid dehydratase: metals, mutants and mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 584-590.

Sieper, L. J., Ford, M., deKock, R. & Kramer, S. (1987) Purification of bovine protoporphyrinogen oxidase: immunological cross-reactivity and structural relationship to ferrochelatase. *Biochem. Biophys. Acta* 913, 349-358.

Smith, A. G., Marsh, O. & Elder, G. H. (1993) Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants. *Biochem. J.* 292, 503-508.

Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F. & Miller, N. E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* 29, 1097-1106.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.

Svedruzic, D., Jonsson, S., Toyota, C. G., Reinhardt, L. A., Ricagno, S., Lindqvist, Y. & Richards, N. G. J. (2005) The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 443, 176-192.

Tanner, A., Bowater, L., Fairhurst, S. A. & Bornemann, S. (2001) Oxalate Decarboxylase Requires Manganese and Dioxygen for Activity. *J. Biol. Chem.* 276, 43627-43634.

Troup, B., Jahn, M., Hungerer, C. & Jahn, D. (1994) Isolation of the *hemF* Operon Containing the Gene for the *Escherichia coli* Aerobic Coproporphyrinogen III Oxidase by In Vivo Complementation of a Yeast *HEM13* Mutant. *J. Bacteriol.* 176, 673-680.

Troup, B., Hungerer, C. & Jahn, D. (1995) Cloning and Characterization of the *Escherichia coli hemN* Gene Encoding the Oxygen-Independent Coproporphyrinogen III Oxidase. *J. Bacteriol.* 177, 3326-3331.

Uden, G. & Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochem. Biophys. Acta* 1320, 217-234.

Van Hellemond, J. J. & Tielens, G. M. (1994) Expression and functional properties of fumarate reductase. *Biochem. J.* 304, 321-331.

Wang, K. F., Dailey, T. A. & Dailey, H. A. (2001) Expression and characterization of the terminal heme synthetic enzymes from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 115-119.

Wang, Y., Huang, S. H., Wass, C. A., Stins, M. F. & Kim, K. S. (1999) The Gene Locus *yijP* Contributes to *Escherichia coli* K1 Invasion of Brain Microvascular Endothelial cells. *Infect. Immun.* 67, 4751-4756.

Warren, M. J. & Jordan, P. M. (1988) Investigation into the Nature of Substrate Binding to the Dipyrrromethane Cofactor of *Escherichia coli* Porphobilinogen Deaminase. *Biochemistry* 27, 9020-9030.

Westenberg, D. J., Gunsalus, R. P., Ackrell, B. A. C., Sices, H. & Cecchini, G. (1993) *Escherichia coli* Fumarate Reductase *frdC* and *frdD* Mutants. *J. Biol. Chem.* 268, 815-822.

White, B. A. (ed.) (1993) PCR Protocols. Human Press. Totowa, NJ.

Whittaker, J. W. (2000) In *Metal ions in biological systems: manganese and its role in biological systems*, vol. 37 (Sigel, A. & Sigel, H. eds.), pp. 587-612, Marcel Dekker, New York.

Woo, E. J., Dunwell, J. M., Goodenough, P. W., Marvier, A. C. & Pickersgill, R. W. (2000) Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1036-1040.

Wu, C. K., Dailey, H. A., Rose, J. P., Burden, A., Sellers, V. M. & Wang, B. C. (2001) The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* 8, 156-160.

Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980a) Coproporphyrinogen oxidase, purification, properties and activation by phospholipids. *J. Biol. Chem.* 255, 4722-4726.

Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980b) Coproporphyrinogen oxidase, reaction mechanism and role of tyrosine residues on the activity. *J. Biol. Chem.* 255, 4727-4731.

Zagorec, M. & Labbe-Bois, R. (1986) Negative Control of Yeast Coproporphyrinogen Oxidase Synthesis by Heme and Oxygen. *J. Biol. Chem.* 261, 2506-2509.

7.2 Internet – Adressen

BLAST-Server:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine,
National Institutes of Health, Bethesda, Md.)

Medline-Server:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/medline>

(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine,
National Institutes of Health, Bethesda, Md.)

NCBI Conserved Domain Database (CDD)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd>

(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine,
National Institutes of Health, Bethesda, Md.)

PRODORIC-Datenbank:

<http://prodoric.tu-bs.de>

(Technische Universität Braunschweig, Arbeitskreis Prof. Dr. D. Jahn)

Expasy:

<http://www.expasy.org>

(Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Swiss)

8 Anhang

Oxygen-dependent Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) from *Escherichia coli* Is Stimulated by Manganese

(Breckau *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 278, 46625-46631)

Oxygen-dependent Coproporphyrinogen III Oxidase (HemF) from *Escherichia coli* Is Stimulated by Manganese*

Received for publication, August 4, 2003, and in revised form, September 11, 2003
Published, JBC Papers in Press, September 15, 2003, DOI 10.1074/jbc.M308553200

Daniela Breckau‡, Esther Mahlitz‡, Anselm Sauerwald‡, Gunhild Layer‡, and Dieter Jahn‡§

From the ‡Institute of Microbiology, Technical University Braunschweig, D-38106 Braunschweig, Germany

During heme biosynthesis in *Escherichia coli* two structurally unrelated enzymes, one oxygen-dependent (HemF) and one oxygen-independent (HemN), are able to catalyze the oxidative decarboxylation of coproporphyrinogen III to form protoporphyrinogen IX. Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase was produced by overexpression of the *E. coli hemF* in *E. coli* and purified to apparent homogeneity. The dimeric enzyme showed a K_m value of 2.6 μM for coproporphyrinogen III with a k_{cat} value of 0.17 min^{-1} at its optimal pH of 6. HemF does not utilize protoporphyrinogen IX or coproporphyrin III as substrates and is inhibited by protoporphyrin IX. Molecular oxygen is essential for the enzymatic reaction. Single turnover experiments with oxygen-loaded HemF under anaerobic conditions demonstrated electron acceptor function for oxygen during the oxidative decarboxylation reaction with the concomitant formation of H_2O_2 . Metal chelator treatment inactivated *E. coli* HemF. Only the addition of manganese fully restored coproporphyrinogen III oxidase activity. Evidence for the involvement of four highly conserved histidine residues (His-96, His-106, His-145, and His-175) in manganese coordination was obtained. One catalytically important tryptophan residue was localized in position 274. None of the tested highly conserved cysteine (Cys-167), tyrosine (Tyr-135, Tyr-160, Tyr-170, Tyr-213, Tyr-240, and Tyr-276), and tryptophan residues (Trp-36, Trp-123, Trp-166, and Trp-298) were found important for HemF activity. Moreover, mutation of a potential nucleotide binding motif (GGGXXTP) did not affect HemF activity. Two alternative routes for HemF-mediated catalysis, one metal-dependent, the other metal-independent, are proposed.

Tetrapyrroles, like the porphyrins heme and chlorophyll, are essential compounds of the metabolism of almost all organisms on earth. They are integral parts of the electron transport chains utilized during photosynthesis and oxidative phosphorylation. Moreover, various enzymes utilize tetrapyrrole cofactors.

During porphyrin biosynthesis coproporphyrinogen III oxidase (CPO,¹ EC 1.3.3.3) catalyzes the oxidative decarboxylation of coproporphyrinogen III (copro) to form protopor-

phyrinogen IX (proto) (Fig. 1). In *Escherichia coli* two structurally unrelated CPOs, one oxygen-dependent (HemF) and one oxygen-independent (HemN), catalyze this reaction (1, 2). The enzymatic mechanisms for both reactions are subjects of controversy. Initial reports on the path of copro decarboxylation was obtained using deuterium- and tritium-labeled propionate side chains of the substrate (3). The enzymatic decarboxylation of ring A always occurs prior to that of ring B, which was shown through the isolation of the intermediate harderoporphyrinogen (4). These experiments suggested an anti-periplanar elimination as part of the mechanism for the formation of the two vinyl groups. Three possible mechanisms for the oxygen-dependent vinyl group formation were proposed. One mechanism involves an oxygen-dependent hydroxylation step. The other two mechanisms are variants of the same basic idea, in that formation of the vinyl groups results in the simultaneous hydride abstraction and decarboxylation (5). A radical based mechanism was recently elucidated for the oxygen-independent CPO HemN from *E. coli* (6). This enzyme belongs to the “radical *S*-adenosylmethionine family” of enzymes (7).

For the interaction of enzymes with molecular oxygen nature often employs metal ions. However, there are conflicting reports on the metal ion contents of various oxygen-dependent CPOs (HemF). Purified recombinant mouse HemF was described to contain copper, native yeast HemF iron and recombinant human HemF were found metal-free (8–11). Surprisingly, no significant influence of the various found metal ions on the activity of the different analyzed CPOs was detected. HemF proteins from plant, animal, and bacterial sources possess an amazingly high conserved amino acid sequence (Fig. 2). First results from site-directed mutagenesis approaches using mouse HemF indicated an involvement of one highly conserved histidine residue in catalysis (8). Moreover, the importance of tyrosine residues was proposed as potential location for a hypothetical tyrosyl radical (12).

Recently, common structural properties were proposed for the oxygen-dependent CPO and urate oxidase (13). Both enzymes utilize oxygen. Based on the assumption that HemF performs a cofactor- and metal ion-independent catalysis a hypothetical enzyme structure was modeled that places HemF into the new family of T-fold proteins.

Here we describe the biochemical and biophysical characterization of purified recombinant *E. coli* CPO. The activity of the enzyme is stimulated by manganese. Molecular oxygen serves as an electron acceptor with results in the generation of H_2O_2 . Catalytically important amino acid residues were identified using site-directed mutagenesis.

* This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Fonds der Chemischen Industrie. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ To whom correspondence should be addressed: Institute of Microbiology, Technical University Braunschweig, Spielmannstr. 7, D-38106 Braunschweig, Germany. Tel.: 49-0-531-3915801; Fax: 49-0-531-3915854; E-mail: d.jahn@tu-bs.de.

¹ The abbreviations used are: CPO, coproporphyrinogen III oxidase; CBP, calmodulin-binding peptide; copro, coproporphyrinogen III; HPLC, high performance liquid chromatography; proto, protoporphyrin

IX; proto, protoporphyrinogen IX; W7, *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene sulfonamide HCl; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid.

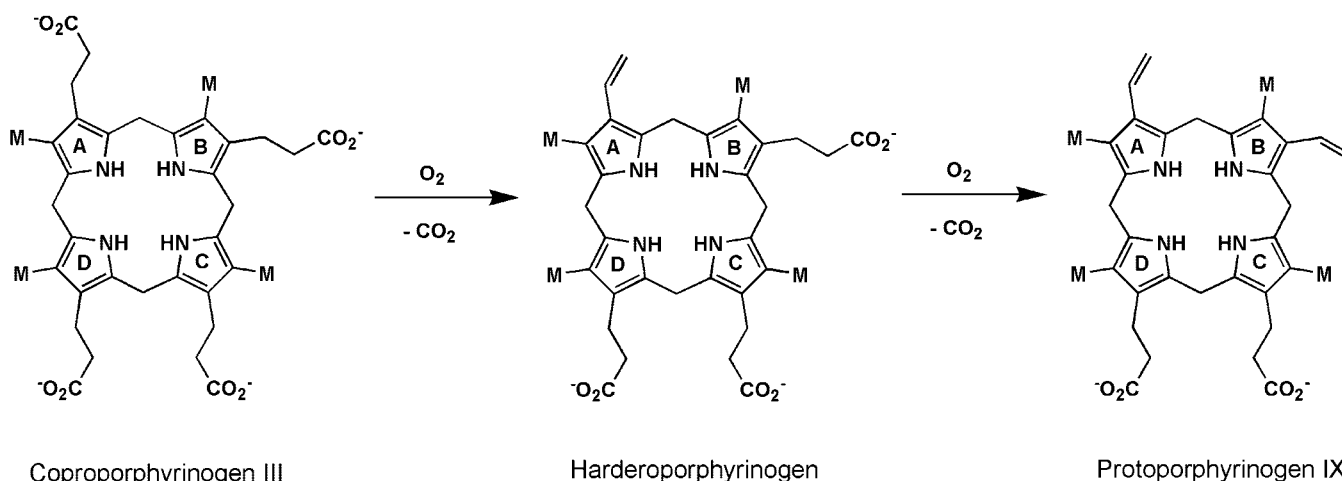


FIG. 1. Scheme of the reaction catalyzed by HemF. The educt coprogen is converted in a two-step reaction into protogen. The two propionate groups at rings A and B are oxidatively decarboxylated to vinyl groups with the release of two molecules CO₂.

<i>Escherichia coli</i>	34	DSWQREGGGGSRVLRNGGVFEQAGVNFSEHVHG ₂₈	GVSLVVFHFNPPYPTSHANVREFLAEPGAEPV...	WWFGGGDLTP			
<i>Homo sapiens</i>	79	DRNERKEGGGGSICVLQDGVFEKAGVSIISVHGX ₂₈	GVSSVIHPKNPYAPTIFHFNRYFVEEA...	DGNKQWFGGGCDLTP			
<i>Mus musculus</i>	79	DRNERKEGGGGSICVLQDGVFEKAGVSIISVHGX ₂₈	GVSSVIHPKNPYAPTIFHFNRYFVEEA...	DGNTHWFGGGCDLTP			
<i>Nicotiana tabacum</i>	121	DVMSRPGGGGHSVLRQDGVFEKAGVNVSVVVGX ₂₈	GVSSVLHPKNPYAPTIFHFNRYFVEEA...	DAPKDAFGAPQWFGGGTDFTP			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	111	DVMSRPGGGGHSRVLDQGVNFVEKAGVNVSVVVGX ₂₈	GVSSVLHPKNPYAPTIFHFNRYFVEEA...	DAPKDAFGAPQWFGGGTDFTP			
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	60	DTWQREGGGGSRVMKNGQLLEGGVNFSEHVHG ₂₈	GVSSVLHFNPPYPTSHANVREFLAEPGAEPV...	WWFGGGDLTP			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35	DAMERFAGGGGRTRVIGDGLIEKGVNFSEHVHG ₂₈	GVSLVVFHFNPPYPTSHANVREFLAEPGAEPV...	WWFGGGDLTP			
Introduced exchanges:		L	L	L	LR	V	AA

<i>Escherichia coli</i>	134	FYGFEEDALHWHRTARDLCLFEGKDVYPRYKWKWCDDYFYIKHRNEORGIGGLFFD.	DLNTPDFDHCFAFMQAVGKGYTDAYLPI					
<i>Homo sapiens</i>	186	TYINQEDAVHFHRTLREACDQHGPDLYPKFKWCDDYFYIAHRGERRGIGGIFFD.	DLDSPSKKEEVRVQSCARAVVPSYIPL					
<i>Mus musculus</i>	186	RYLNQEDAVHFHRTLREACDQHGPDLYPKFKWCDDYFYIVHRGERRGIGGIFFD.	DLDSPSKKEEAFRFVKTCAEAVVPSYVPI					
<i>Nicotiana tabacum</i>	231	AYIFEEDVKHFFHSVOKAACDKEDASFYPRYKWKWCDDYFYIKHRDERRGLGGIFFD.	DENDYDQEMLLSESTBCANSVIPAYIPI					
<i>Arabidopsis thaliana</i>	220	AYIFEEDVKHFFHSVOKAACDKEDASFYPRFKKWCDDYFYIKHRDERRGLGGIFFD.	DLNDYDQEMLLSEATBCANSVIPAYIPI					
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	155	YVPEAEDAKHFFHQAACDRHREYYPYPRFKKWCDDYFYIKHRGTRGVGGIFFDX ₂	SICGRSWEDLFAETQSCGGAFLBAYLPI					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	135	YVAHEEDCVHWHRVARDACAPFGADVYPRYKWKWCDDYFYIKHRNEORGIGGLFFD.	DLNQWDFDTCFAIRAIIGDAYIDAYLPI					
Introduced exchanges:		F	L	F	LS	F	L	F

<i>Escherichia coli</i>	217	VEKRKAMAYGERERNOLYRRGRYVEFNLVDRGTFLGL.	QTGGRTESILMSLPLVRWEYDYCPKDGSPFAALSE.	FIKVRDQV			
<i>Homo sapiens</i>	269	VKKHCDDSTFPOEKLWQQLRRGRYVEFNLLYDRGTFLGLFTFGSRIESILMSLPLTARWEYMHSPSPNSKEAEILEVLRHPQDQV	VKKHCDDSTFPOEKLWQQLRRGRYVEFNLLYDRGTFLGLFTFGSRIESILMSLPLTARWEYMHSPSPNSKEAEILEVLRHPQDQV				
<i>Mus musculus</i>	269	VKKHCDDSTFPOEKLWQQLRRGRYVEFNLLYDRGTFLGLFTFGSRIESILMSLPLTARWEYMHSPSPNSKEAEILEVLRHPQDQV	VKKHCDDSTFPOEKLWQQLRRGRYVEFNLLYDRGTFLGLFTFGSRIESILMSLPLTARWEYMHSPSPNSKEAEILEVLRHPQDQV				
<i>Nicotiana tabacum</i>	314	VEKRKDTPTFDKKAQQLRRGRYVEFNLLYDRGTFLGL.	KTGGRIESILVSLPLTARWEYDHPKEEGTEEWKLLDACINPKEMI				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	303	VEKRKDMFTTEQKKAQQLRRGRYVEFNLLYDRGTFLGL.	KTGGRIESILVSLPLTARWEYDHPKEEGTEEWKLLDACINPKEMI				
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	265	VERRRLTYGDRERQOLYRRGRYVEFNLVDRGTFLGL.	QTNGRTESILMSLPLVRWEYGYTPENPSREAEIYSTELRPOQV				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	218	VQRKKEPTFDERQREFQAYRRGRYVEFNLVDRGTFLGL.	QSGGRTESILMSLPLPQVRWGYDKPKPEEGSEEARLSTEFYELADRWL				
Introduced exchanges:		F	L	F	L	F	L

FIG. 2. Amino acid sequence alignments of conserved regions of vertebrate, plant, and bacterial HemFs. Amino acid exchanges introduced into *E. coli* HemF via site-directed mutagenesis are indicated.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of the *E. coli* hemF Expression Vector pCalhemF—A DNA fragment encoding all amino acid residues of *E. coli* HemF was generated by polymerase chain reaction from genomic DNA using primer 1 (5'-GAAAAGGGATCCGTTATGAAACC-3') and primer 2 (5'-AGCGGATCTCGAGTGGGGG-3'). The resulting DNA fragment was digested with BamHI and XhoI (recognition sequences underlined in the primer sequences) and ligated in the appropriately digested vector pCal-n (Stratagene, Heidelberg, Germany) to generate pCalhemF, which is under control of a T7 RNA polymerase promoter. The integrity of the plasmid was confirmed by DNA sequencing. The resulting fusion protein with a calculated molecular mass of 38,325 Da consists of the N-terminal calmodulin-binding peptide (CBP) of 4,000 Da fused via a thrombin recognition sequence to *E. coli* HemF of 34,325 Da. After proteolytic cleavage of the fusion protein with thrombin, three additional amino acids (VPR) instead of the original methionine are localized at the N terminus of HemF.

Site-directed Mutagenesis of *E. coli* hemF—Mutant pCalhemF plasmids encoding *E. coli* HemF with amino acid exchanges H96L, H106L, H145L, H175L, C167S, Y135F, Y160F, Y170F, Y213F, Y240F, W36L, W123L, W166L, W274L, W298L, W124R, G127V, T132A, and P133A were constructed using the QuikChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Heidelberg, Germany). The primer used to generate the mutations were: H96L forward, 5'-GGCGTTTCACTGGTAGTGCTTC-CGCATAACCCG-3'; H106L forward, 5'-CCCACCAGCCTCGCAATG-

TGCGG-3'; H145L forward, 5'-GCTATTCACTGGCTTCGCACCGCC-3'; H175L forward, 5'-CTTCTACCTCAAACCTCGCAACGAACAGCG-3'; C167S forward, 5'-CCCCGTTACAAAAAGTGGTCCGACGAATACT-TCTAC-3'; Y135F forward, 5'-CGACTTAACCCCATCTTTGTTTTC-AAGAAGAT-3'; Y160F forward, 5'-CCATTGTGGCGAAGACGTTTTTC-CCCGTTACAAAAAG-3'; Y170F forward, 5'-GTTGTGCGACGAATTC-TTCTACCTCAAACATCGC-3'; Y213F forward, 5'-GCTACACCGACG-CTTTTTTACCAATTGTCGAGCG-3'; Y240F forward, 5'-CGCGGTGCG-TTTGTCTGGATCAATCTGGTCTGG-3'; Y276F forward, 5'-CTGGT-ACGCTGGGAATTTGATTATCAGCCAAAAGATG-3'; W36L forward, 5'-GTCGAAGATAGTTTGCAGCGCGAAGCTG-3'; W123L forward, 5'-CGATCCCGTCTTGTGTTTGGCGGTG-3'; W124R forward, 5'-GATC-CCGTCTGGAGTTTGGCGGTGGC-3'; W166L forward, 5'-CCCCGT-TACAAAAAGTTGTGGCGACGAATACTTC-3'; W274L forward, 5'-GCC-ACTGGTACGCTTGGAAATATGATTATCAGC-3'; W298L forward, 5'-G-GTCAGGGAATTTGGTGTAACTCCCTCAC-3'; G127V forward, 5'-CTG-GTGGTTTGGCGTTGGCTTCGACTTAACC-3'; T132A forward, 5'-GC-TTCGACTTACCCCATCTATGG-3'; P133A forward, 5'-GCTTCGA-CTTAACCGCATCTATGTTTTG-3'. All mutated hemF genes were subjected to complete DNA sequence determination.

Overexpression of *E. coli* hemF and Purification of HemF—*E. coli* BL21(DE3) cells carrying the wild type or mutated pCalhemF were grown in LB medium at 37 °C with shaking at 200 rpm (14). When the cultures reached an A₅₇₈ of 0.7 protein production was induced by addition of 100 μM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside. The cells

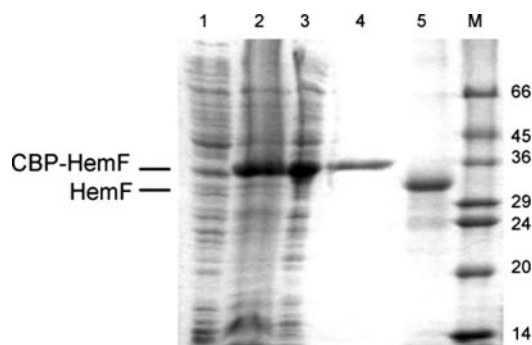


FIG. 3. **Purification of recombinant *E. coli* HemF.** SDS-PAGE analysis of the proteins in a cell-free extract prepared from *E. coli* BL21(DE3) carrying pCalhemF before isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside induction (lane 1), after isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside induction of gene expression (lane 2), the soluble proteins after cell disruption (lane 3), the purified HemF-CBP fusion protein after affinity chromatography (lane 4), and HemF after thrombin removal of the CBP tag (lane 5). Lane M represents the proteins of the dalton marker (Sigma). Indicated numbers represent $M_r \times 1000$ of the marker proteins.

were further cultivated at 30 °C overnight, harvested, washed three times using buffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7.2, 200 mM NaCl, 2.5 mM $MnCl_2$, 0.1% Triton X-100), and resuspended in a minimal volume of buffer A. Cells were broken by sonification (Bandelin HD 2070, 0.3 s sound, 0.7 s paused, MS73 tipp, 50% amplitude) and cleared by centrifugation at $175,000 \times g$ for 45 min. Proteins of the supernatant were incubated with calmodulin affinity material (Amersham Biosciences) at 4 °C with rigorous shaking overnight for efficient CBP-HemF binding. After washing three times with buffer A the bound CBP-HemF fusion protein was eluted in 10 ml of buffer B (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 0.1% Triton X-100 including 10 mM calmodulin inhibitor W7, obtained from Sigma). After concentration and desalting of the CBP-HemF solution the CBP tag was cleaved off using 50–70 units of thrombin protease per 4 mg of fusion protein in buffer C (50 mM Tris/HCl, pH 8.3, 200 mM NaCl). The CBP of 3,646 Da was removed from *E. coli* HemF via dialysis using dialysis tubing with a molecular weight cut-off of 20,000. The homogeneity and integrity of the purified HemF was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal protein sequencing, and mass spectrometry.

Determination of Protein Concentration—The BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit (Pierce) was used according to the manufacturer's instructions using bovine serum albumin as a standard.

N-terminal Protein Sequencing and Mass Spectrometry—The N terminus of the purified enzyme was determined by Edman degradation as described before (6). The molecular mass was determined using electrospray ionization mass spectrometry as outlined before (6).

Determination of the Native Molecular Mass of HemF—The relative native molecular mass of HemF was determined using gel permeation chromatography and glycerol gradient centrifugation as previously described (15). Isoelectric focusing electrophoresis was performed as outlined before (15).

UV-Visible Light Absorption Spectroscopy—UV-visible absorption spectra (190 to 730 nm) were recorded using a PerkinElmer Lambda 2 spectrophotometer as described before (6).

Coproporphyrinogen III Oxidase Assay Using Recombinant HemF—The substrate coprophen was generated as described previously (6). In a total volume of 500 μ l of 334 nM HemF, 20 μ M coprophen, 0.1% Triton X-100, 50 mM MES/HCl, pH 6.0, were incubated at 37 °C for 10–20 min under rigorous shaking at 1000 rpm in the dark. Reactions were stopped by the addition of 50 μ l of H_2O_2 to oxidize generated proto and residual coprophen. After 10–20 min oxidation the fluorescence of the produced proto was measured as described before (6). For kinetic HemF characterization a total reaction volume of 5 ml was employed, 500- μ l samples were taken at the indicated time points and processed as outlined above.

Anaerobic HemF Preparation and Testing—Growth conditions for *E. coli* BL21(DE3) carrying pCalhemF, enzyme production and purification were identical to what is outlined above with the exception of the following introduced modifications. For strict anaerobic conditions *E. coli* BL21 carrying pCalhemF were grown anaerobically in anaerobic flasks with shaking at 100 rpm. Induction of protein production by the

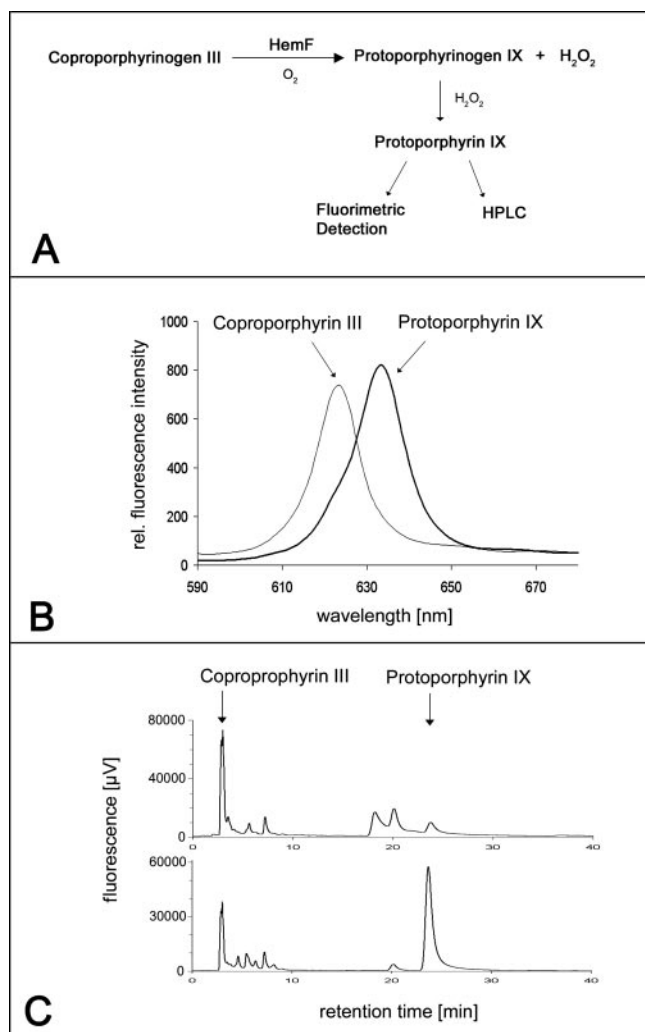


FIG. 4. **Enzymatic conversion of coprophen into proto by recombinant *E. coli* HemF.** A, HemF catalyzes the oxidative decarboxylation of coproporphyrinogen III to protoporphyrinogen IX in the presence of O_2 . The product of the enzymatic reaction is oxidized by addition of H_2O_2 . The formed protoporphyrin IX is detected fluorimetrically and by HPLC analysis of the reaction product. B, fluorimetric detection of the oxidized substrate (coproporphyrin) at 618 nm and product (protoporphyrin) at 633 nm. Presented are the emission spectra from 590 to 680 nm with an excitation wavelength of 409 nm. A standard enzymatic assay was used as described under "Experimental Procedures." The thick line represents the fluorescence spectrum of proto produced by HemF from coprophen and oxidized by H_2O_2 treatment. The thin line represents the fluorescence spectrum of the substrate coprophen incubated in the absence of enzyme and oxidized by H_2O_2 treatment. C, the enzymatic reaction of HemF was stopped with hydrogen peroxide immediately after mixing all components of the assay (reaction time = 0). The solution was treated as described under "Experimental Procedures" and 20 μ l were injected onto the HPLC column. The fluorescence was detected at 630 nm (excitation 409 nm). Coproporphyrin elutes with a retention time of 3.01 min. If the reaction was stopped after 90 min the increased proto peak produced from HemF at a retention time of 23.7 min is clearly visible.

addition of 100 μ M isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside was performed at an A_{578} of 0.2. Cells were broken under strict anaerobic conditions using a French press (6). The preparation of the cell-free extract and chromatographic enzyme purification were performed in an anaerobic chamber under nitrogen atmosphere (6). Enzyme assays were performed up to 48 h under strict anaerobic conditions as outlined above.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis—Enzyme assays were performed as outlined above. HPLC analysis of HemF product formation was performed as described previously (6) using separation on a ODS Hypersil C18 reversed phase column (5 μ m, 120 Å pore width, 25-cm length, 4.6-mm inner diameter).

FIG. 5. Spectroscopic characterization of recombinant *E. coli* HemF and various HemF mutant enzymes. UV-visible light absorption spectra of recombinant, purified HemF proteins. Spectra were recorded for wild type HemF (A) and the mutated enzymes H175L (B), H106L (C), H96L (D), and H145L (E). The mutant H175L (B) is missing the typical absorbance spectrum for porphyrins.

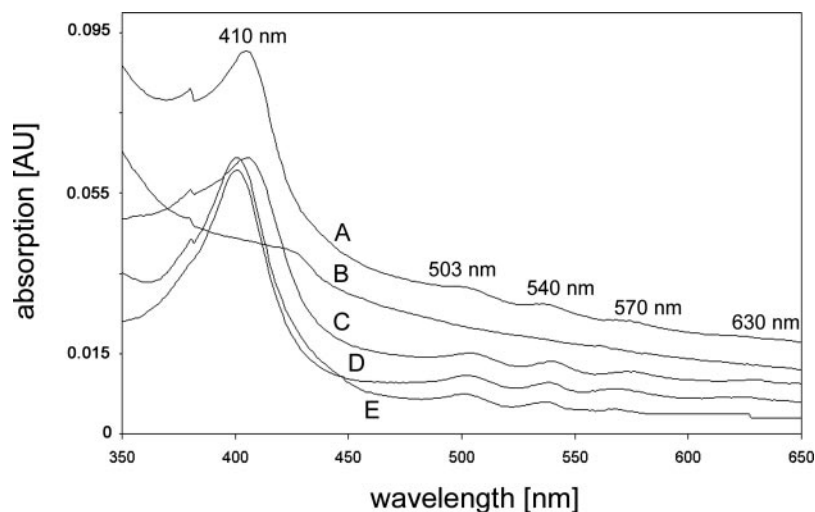


TABLE I
Substrate turnovers catalyzed by HemF prepared and tested in the presence and absence of oxygen

Preculture	Main culture	Protein purification	Enzyme assay ^a	Turnover ^b
Aerobic	Aerobic	Aerobic	Aerobic	21.5
Aerobic	Anaerobic	Anaerobic	Anaerobic	0.8
Anaerobic	Anaerobic	Anaerobic	Anaerobic	ND ^c

^a 334 nmol of HemF were incubated at 37 °C under standard assay conditions under aerobic or strict anaerobic conditions as outlined under "Experimental Procedures." The reaction was started by the addition of 20 μ mol of substrate. Produced product was quantified after H₂O₂ oxidation as shown in Fig. 4 and described under "Experimental Procedures."

^b Product formation was measured over a time of 90 min. The amount of proto measured after this time was related to the amount of employed HemF in the enzyme assay.

^c ND, not detectable.

Detection of H₂O₂ Produced during the Enzyme Reaction—Enzyme assays were performed as outlined above without adding H₂O₂ to stop the reaction. Detection of hydrogen peroxide produced during the enzyme reaction was performed using the Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase assay kit (Molecular Probes, Leiden, Netherlands).

Metal Ion Analysis—Metal analysis was performed by flame ionization atomic absorption spectroscopy using a PerkinElmer 3100 atomic absorption spectrometer. Manganese was measured at 279.5 nm, iron at 248.3 nm, and copper at 327.4 nm using a manganese, iron, or copper hollow cathode lamp. The metal standards were purchased from Merck (Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Production, Purification, and Initial Biochemical Characterization of Recombinant *E. coli* HemF—A T7 RNA polymerase driven system was used to produce *E. coli* HemF as a N-terminal fusion protein with the CBP. Affinity chromatography on a calmodulin affinity matrix resulted in apparent homogeneous fusion protein as judged by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Coomassie Blue staining (Fig. 3). Usually, the employed affinity chromatography material is eluted using the metal chelator EGTA for the removal of the Ca²⁺ ions that mediate CBP binding to the calmodulin affinity resin. However, we soon discovered significant HemF inactivation by EGTA treatment because of the complexation of the obviously required metal ions. Alternatively, we established a purification scheme in which the affinity column was eluted with the calmodulin inhibitor W7. Subsequently, the CBP tag was removed from recombinant purified HemF using thrombin cleavage and dialysis. The apparent homogeneity and integrity of *E. coli* HemF was confirmed by electrospray ionization mass spectrometry and isoelectric focusing. The N-terminal sequence of the purified enzyme

TABLE II
Influence of chelating reagents, metal ions, nucleotides, and possible inhibitors on enzyme activity

Treatment ^a	Additions	HemF activity ^b
		%
	10 mM MnCl ₂	42
10 mM α,α' -Dipyridyl		100
10 mM <i>o</i> -Phenanthroline		35
10 mM EGTA		29
10 mM EGTA	10 mM <i>o</i> -Phenanthroline	16
10 mM EGTA	10 mM CoCl ₂	ND ^c
10 mM EGTA	10 mM NiCl ₂	15
10 mM EGTA	10 mM ZnCl ₂	14
10 mM EGTA	10 mM FeCl ₂	6
10 mM EGTA	10 mM MgCl ₂	15
10 mM EGTA	10 mM AlCl ₃	12
10 mM EGTA	10 mM CuCl ₂	11
10 mM EGTA	1 mM MnCl ₂	34
10 mM EGTA	10 mM MnCl ₂	60
10 mM EGTA	200 μ M HgCl ₂	100
0.5 mM SAM	200 μ M PbCl ₂	ND
0.5 mM NAD ⁺	200 μ M PdCl ₂	ND
0.5 mM NADH	10 mM MnCl ₂	ND
0.02 mM copro	10 mM MnCl ₂	100
0.02 mM proto	10 mM MnCl ₂	75
0.02 mM DSA	10 mM MnCl ₂	90
	10 mM MnCl ₂	110
	10 mM MnCl ₂	50 ^d
	10 mM MnCl ₂	95

^a Purified recombinant *E. coli* HemF was preincubated with additions listed above for 60 min at 37 °C. Enzymatic assay were performed as described under "Experimental Procedures." Combined EGTA and *o*-phenanthroline treatment fully abolished HemF activity. This treatment partially destroyed the HemF structure as detected by CD spectroscopy (data not shown). To prevent these secondary effects we tested metal dependence by single EGTA treatment.

^b The fully active enzyme after MnCl₂ treatment was set to 100% and all other activities were related to that.

^c ND, not detectable.

^d Kinetic studies showed a $K_i = 6 \mu$ M for a mixed inhibition.

determined by Edman degradation (VPRMKPDAHQVKQFLN-LQDT) was found identical to the amino acid sequence deduced from *E. coli* HemF plus three additional N-terminal amino acids left from the cleavage of the fusion protein.

Recombinant purified *E. coli* HemF showed a dimeric structure when analyzed by gel permeation chromatography and glycerol gradient centrifugation (data not shown). This is in good agreement with the mainly dimeric CPOs isolated from animal, yeast, and plant sources (16, 10).

Catalytic and Spectral Properties of *E. coli* HemF—Two different enzymatic test systems were previously employed for the

determination of HemF activity. One test uses a fluorimetric and the other test a radiochemical detection. As a consequence of the different sensitivities of both test systems significant discrepancies in the measured kinetic parameters for various HemFs from various organisms were observed. The K_m values for coproporphyrinogen III obtained for eukaryotic CPOs varied from <1 to $>10 \mu\text{M}$ depending on the employed assay. In this investigation a fast and sensitive fluorimetric assay was employed (17). The product of the enzymatic reaction (protopogen) was first chemically oxidized by hydrogen peroxide to proto, which was subsequently quantified by fluorescence spectroscopy. Using this method a K_m value of $2.6 \mu\text{M}$, a k_{cat} value of 0.17 min^{-1} , and a V_{max} value of $1.3 \mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ was determined for *E. coli* HemF and its substrate coproporphyrinogen III. Identification of the enzymatic reaction product protopogen was achieved using HPLC (Fig. 4). The pH optimum of the enzyme was localized at 6. This value is much lower compared with values obtained for eukaryotic CPOs that

showed pH optima between 6.8 and 8.6. Recombinant HemF was unable to convert protogen to proto, which is in contrast to an earlier publication (18) that describes this oxidation for *E. coli* CPOs. In addition no inhibition by coprogen and protogen was observed as it had been described for eukaryotic CPO (19, 20). Only the addition of $20 \mu\text{M}$ proto significantly inhibited HemF activity, whereas all other compounds including coproporphyrin and deuteroporphyrin IX 2,4-disulfuric acid revealed no effect (see Table II). The UV-visible spectrum of purified *E. coli* HemF showed a Soret band at 410 nm besides the classic protein band at 283 nm. Together with 4 smaller peaks at 503, 540, 570, and 630 nm this spectrum is typical for enzyme-bound porphyrin compounds (Fig. 5, spectrum A), (21). Control experiments including the spectral analysis of HemF incubated with various known porphyrins indicated the presence of bound protoporphyrin. The physiological relevance of this observation remains to be determined.

Oxygen-loaded *E. coli* HemF Allows One Catalytic Turnover under Anaerobic Conditions—Surprisingly, the *HEM13* gene of yeast and the *hemF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* both encoding oxygen-dependent CPOs are drastically induced under anaerobic growth conditions (22, 23). Similar findings were described for oxygen-dependent ribonucleotide reductase from *E. coli* (24). Later enzyme requires an aerobic activation by oxygen for the formation of a protein radical. After radical formation it is able to perform multiple rounds of catalysis even under strict anaerobic conditions because of the regeneration of the enzyme radical. In this context it is important to remember that oxygen-independent CPO HemN is an enzyme generating the catalytically required radical via the homolytic cleavage of reduced *S*-adenosylmethionine (6).

To discriminate between a function of oxygen in radical formation or a possible single turnover function as electron acceptor purified recombinant HemF was analyzed under anaerobic conditions. HemF enzyme was anaerobically produced and purified to prevent the contact to molecular oxygen. As expected, this enzyme preparation failed to catalyze coprogen conversion under anaerobic conditions. This observation confirms the absolute oxygen requirement for HemF function. However, if HemF is exposed to oxygen during the recombinant protein production, but purified and tested anaerobically, a single turnover reaction can be monitored (Table I). These observations support an electron acceptor function for oxygen.

Hydrogen Peroxide Development during *E. coli* HemF Catalysis—To follow oxygen reduction during coprogen oxidation, hydrogen peroxide formation was determined using a sensitive commercial detection system. After calibration of the system hydrogen peroxide generation during HemF catalysis was observed (data not shown).

***E. coli* HemF Is a Manganese-dependent CPO**—The involvement of molecular oxygen during the enzymatic reaction cata-

TABLE III
Kinetic parameters of produced HemF mutants

HemF enzyme ^a	Activity ^b	K_m	V_{max}	Bound manganese ^c
	%	μM	nm/min	
Wild type	100	2.6	1.3	+
C167S	100	1.6	3	NT ^d
H96L	ND ^e	ND	ND	—
H106L	ND	ND	ND	—
H145L	ND	ND	ND	(-) ^f
H175L	ND	ND	ND	(-)
Y135F	100	3.8	2.6	NT
Y160F	105	3.5	2.4	NT
Y170F	95	4.1	2.8	NT
Y213F	97	3	2.3	NT
Y240F	99	2	4	NT
Y276F	100	4.3	3	NT
W36L	98	4.3	3	NT
W123L	103	3.3	2.7	NT
W166L	100	3	2	NT
W274L	ND	ND	ND	+
W298L	102	3.2	2.2	NT
W124R	100	3.6	1	NT
G127V	105	2.1	1.7	NT
T132A	110	3	2	NT
P133A	98	3.5	2.5	NT

^a HemF mutant enzymes were produced and purified as described under "Experimental Procedures."

^b Enzymatic assays were performed as described under "Experimental Procedures."

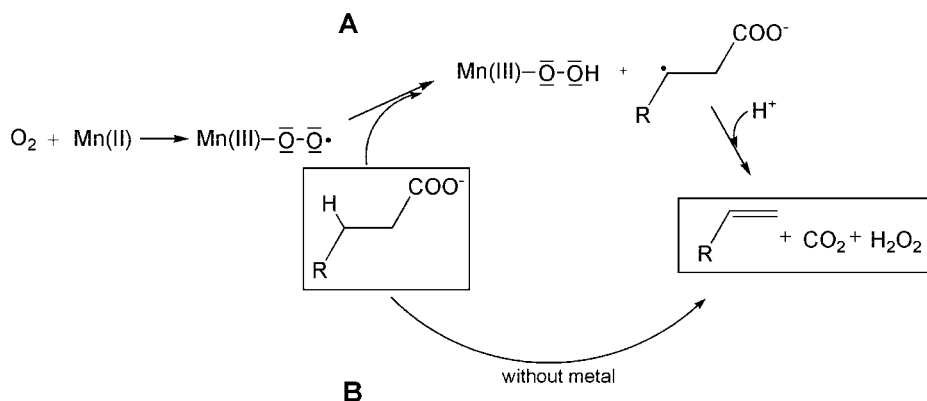
^c Manganese detection was performed via atomic absorption spectroscopy as described under "Experimental Procedures."

^d NT, not tested.

^e ND, not detectable.

^f Parentheses indicate varying manganese content (see text for details).

FIG. 6. Two possible catalytic pathways of the reaction catalyzed by *E. coli* HemF. A, potential catalytic mechanism with the involvement of manganese. B, metal free catalysis.



lyzed by *E. coli* HemF made the participation of metal ions very likely. Enzyme assays employing HemF pretreated with various metal chelators were performed. EGTA treatment resulted in a significant loss of CPO activity of HemF. Different metal ions in concentrations between 0.25 and 20 mM were added to the enzyme assay. Only the presence of manganese ions restored CPO activity with a maximum enzyme activity at a concentration of 10 mM. Other divalent metal ions including copper, iron, magnesium, cobalt, and nickel failed to reactivate HemF (Table II). In agreement with the observed metal dependence the enzyme was inhibited by low concentrations of heavy metal ions (Table II).

To investigate for a structural function of the bound manganese, gel permeation chromatography analysis was performed. Both native HemF and EGTA-treated enzyme showed a dimeric structure (data not shown). CD spectroscopy revealed no detectable difference between EGTA-treated and native HemF (data not shown). Therefore, a possible role of manganese for the maintenance of its dimeric structure was ruled out. Alternatively, participation of manganese in catalysis seemed to be possible.

Identification of Histidine and Tryptophan Residues Essential for *E. coli* HemF Activity—To initially analyze *E. coli* HemF for the participation of specific amino acid residues in catalysis and metal binding, chemical protein modification experiments were carried out. Previous studies using eukaryotic CPOs pointed toward a possible involvement of tyrosine (12) and histidine residues (8) in enzyme activity. In agreement with these observations, treatment of HemF with 2-hydroxy-5-nitrophenylbromide, *N*-chlorosuccinimide, diethylpyrocarbonate, iodoacetamide, and tetranitromethane indicated the importance of histidine, tyrosine, and tryptophan residues for *E. coli* HemF activity (data not shown). To directly identify amino acid residues required for enzyme activity we mutated the codons for 6 highly conserved tyrosine residues in positions 135, 160, 170, 213, 240, and 276, for the conserved cysteine residue in position 167, for 6 tryptophan residues in positions 36, 123, 124, 166, 274, and 298, and for 4 histidine residues in positions 96, 106, 145, and 175 (Fig. 2). The purified recombinant *E. coli* HemFs bearing a mutated amino acid residue were first kinetically analyzed. Table III shows that mutation of each one of the four highly conserved histidine residues and of one tryptophan residue resulted in a complete loss of enzyme activity. Interestingly, the same histidine residues were mutated in the mouse enzyme (8), where only the mutation H158L, which corresponds to H106L in *E. coli*, abolished enzyme activity. None of the mutated tyrosine residues were found to be essential for enzyme activity. CD spectroscopy of the various mutated enzymes showed that none of the introduced mutations caused a significant change in protein structure (data not shown). A short conserved sequence motif (GGGXXTP) was also found in oxygen-independent CPOs (HemN) and some other nucleotide-binding enzymes (6, 7). We introduced four mutations of this sequence motif, each introducing a single amino acid residue exchange. However, none of these amino acid exchanges influenced enzyme activity (Table III, last four rows). In agreement, addition of several different nucleotides to the oxygen-dependent CPO activity assay did not change enzyme activity (Table II).

Histidine Residues Potentially Involved in Manganese and Porphyrin Binding—The essential histidine residues could be involved in metal binding or in other important catalytic processes. Interestingly, the UV-visible spectra of HemF-H96L, HemF-H106L, and HemF-H145L were identical to the spectrum of the wild type enzyme, whereas the HemF mutant H175L showed no absorbance related to bound porphyrins (Fig.

5). This observation might indicate a possible role of histidine 175 in substrate or product binding.

The wild type enzyme and various inactive HemF mutant enzymes were subjected to metal analysis using atomic absorption spectroscopy. No significant amounts of iron or copper were detected. Because of the incomplete manganese insertion into recombinant wild type HemF, indicated by the strong stimulation of enzyme activity by the addition of manganese to the purified protein, only 0.2 to 0.6 mol of manganese/mol of HemF were measured. In contrast to that, mutant HemF H106L did not contain detectable amounts of manganese, whereas H96L showed a significantly reduced manganese content. However, the manganese content of H145L and H175L varied between different preparations within a range of 0.04 to 0.4 mol of manganese/mol of subunit (H145L) and 0.005 to 0.5 mol of manganese/mol of subunit (H175L). This observation points toward a potential, however, not essential role of these residues in metal chelation. Nevertheless, all investigated mutations of histidine residues lead to a complete inactivation of HemF. The potential double function of His-175 in substrate/product binding and manganese coordination is subject to ongoing work.

The Role of Manganese in *E. coli* HemF Activity—In nature manganese is found to coordinate and activate oxygen. One example for such a manganese containing enzyme is oxalate oxidase, which converts oxalic acid using oxygen to CO₂ and H₂O₂ (25). Biochemical and spectroscopic studies demonstrated that barley oxalate oxidase utilizes a mononuclear manganese center for catalysis (26, 27). One proposed mechanism for the barley enzyme includes the involvement of a Mn(III)-superoxo form in catalysis (28). In light of the radical enzyme mechanism elucidated for the oxygen-independent CPO HemN a possible role of HemF-bound manganese could lay in the binding of O₂ to produce a Mn(III)-superoxo species. The formed radical leads to the abstraction of a hydrogen atom from the β -C atom of the propionate side chain of the substrate and the formation of a substrate radical (Fig. 6A). During the final formation of the vinyl group with the elimination of CO₂, oxygen could function as electron acceptor leading to hydrogen peroxide formation. Alternatively, a purely structural but essential role of manganese without any participation in the enzymatic mechanism is a second possibility (Fig. 6B). To our knowledge currently there is no proven model available for an oxygen-dependent enzyme mechanism without cofactor or metal participation. Nevertheless, at this state we cannot experimentally distinguish between these two possible roles of manganese in HemF function.

Acknowledgments—We thank Dr. E. Schiltz (University Freiburg, Germany) for protein sequencing, Dr. Igloi (University Freiburg, Germany) for DNA sequencing, and C. Warth for the mass spectrometry analysis.

REFERENCES

1. Troup, B., Jahn, M., Hungerer, C., and Jahn, D. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 673–680.
2. Troup, B., Hungerer, C., and Jahn, D. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 3326–3331.
3. Seehra, J. S., Jordan, P. M., and Akhtar, M. (1983) *Biochem. J.* **209**, 709–718.
4. Jackson, A. H., Jones, D. M., Philip, G., Lash, T. D., Batlle, A. M., and Smith, S. G. (1980) *Int. J. Biochem.* **12**, 681–688.
5. Akhtar, M. (1994) in *The Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigments* (Jordan, P. M., ed) pp. 131–155, Wiley, Chichester, United Kingdom.
6. Layer, G., Verfürth, K., Mahlitz, E., and Jahn, D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 34136–34142.
7. Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F., and Miller, N. E. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 1097–1106.
8. Kohno, H., Furukawa, T., Tokunaga, R., Taketani, S., and Yoshinaga, T. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1292**, 156–162.
9. Labbe, P., Camadro, J.-M., and Chambon, H. (1985) *Anal. Biochem.* **149**, 248–260.
10. Labbe, P. (1997) *Methods Enzymol.* **281**, 367–378.
11. Medlock, A. E., and Dailey, H. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32507–32510.
12. Yoshinaga, T., and Sano, S. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 4727–4731.
13. Colloch, N., Mornon, J. P., and Camadro, J. M. (2002) *FEBS Lett.* **526**, 5–10.
14. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) in *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

15. Frankenberg, N., Heinz, D. W., and Jahn, D. (1999) *Biochemistry* **38**, 13968–13975
16. Yoshinaga, T. (1997) *Methods Enzymol.* **281**, 355–367
17. Kruse, E., Mock, H.-P., and Grimm, B. (1995) *Planta* **196**, 796–803
18. Narita, S., Taketani, S., and Inokuchi, H. (1999) *Mol. Gen. Genet.* **261**, 1012–1020
19. Jones, M. A., He, J., and Lash, T. D. (2002) *J. Biochem.* **131**, 201–205
20. Mamet, R., Scharf, R., Keller, N., Zimmels, Y., and Schoenfeld, N. (1994) *J. Microbiol. Methods* **19**, 173–178
21. Smith, K. M. (1976) *Porphyrins and Metalloporphyrins*, 2nd Ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
22. Zagorec, M., and Labbe-Bois, R. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2506–2509
23. Rompf, A., Hungerer, C., Hoffmann, T., Lindenmeyer, M., Römling, U., Gross, U., Doss, M. O., Arai, H., Igarashi, Y., and Jahn, D. (1998) *Mol. Microbiol.* **29**, 985–997
24. Reichard, P. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 149–155
25. Lane, B. G. (1994) *FASEB J.* **8**, 294–301
26. Requena, L., and Bornemann, S. (1999) *Biochem. J.* **343**, 185–190
27. Woo, E. J., Dunwell, J. M., Goodenough, P. W., Marvier, A. C., and Pickersgill, R. W. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1036–1040
28. Tanner, A., Bowater, L., Fairhurst, S. A., and Bornemann, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 43627–43634

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Dieter Jahn für die Vergabe des interessanten Themas und die damit verbundene Aufnahme in seine sehr nette Arbeitsgruppe. Für die hervorragende und motivierende Betreuung sowie für die Möglichkeit viele neue Erfahrungen in der wissenschaftlichen Arbeit zu gewinnen möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Koreferats danke ich Herrn PD Dr. D. Heinz, sowie Herrn Prof. Dr. R. Mendel für die freundliche Teilnahme an der Prüfungskommission.

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. F. Neese (MPI für Bioanorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr) für die Möglichkeit der Aufnahme, sowie für die Hilfe bei der Auswertung von ESR-Spektren.

Erkenntlich zeigen möchte ich mich auch bei Dr. L. Jänsch und Mitarbeitern für die MS-Identifizierung von vielen Proteinen.

Für die Überlassung verschiedener Plasmide und Stämme möchte ich mich bei Dr. Esther Mahlitz, Dr. Anselm Sauerwald und Dr. G. Cecchini (University of California, San Francisco, USA) bedanken.

Bei Dr. Gunhild Layer, Dr. Frederic Frere und Dr. Katrin Grage möchte ich mich besonders für die sehr freundschaftliche Atmosphäre im Labor bedanken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Jahn bedanke ich mich für die angenehme und kameradschaftliche Atmosphäre.

Ein ganz besonders lieber Dank gilt meinem Partner Heimo Lemke, der mich schon lange Zeit begleitet und ohne den ich nicht das geworden wäre, was ich heute bin.